

DORSAY
BIB. A. N.
176

UNIVERSITE PARIS - SUD
CENTRE DORSAY

ANTONIEWSKI Jacques

THESE de DOCTORAT-INGENIEUR

"REGULATION DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE
DE LA METHIONINE CHEZ SACCHAROMYCES
CEREVISIAE : ASPECTS PHYSIOLOGIQUES"

soutenue le 19 décembre 1972, devant la Commission d'examen

M. P. SCHAEFFER	Président
M. J.C. PATTE	Rapporteur
M. G.N. COHEN	Examineur
Mme H. de ROBICHON-SZULMAJSTER	Examineur

U N I V E R S I T E P A R I S - S U D

ANTONIEWSKI Jacques

THESE de DOCTORAT-INGENIEUR

"REGULATION DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE
DE LA METHIONINE CHEZ SACCHAROMYCES
CEREVISIAE : ASPECTS PHYSIOLOGIQUES"

soutenue le 19 décembre 1972, devant la Commission d'examen

M. P. SCHAEFFER	Président
M. J.C. PATTE	Rapporteur
M. G.N. COHEN	Examineur
Mme H. de ROBICHON-SZULMAJSTER	Examineur



J'ai conscience d'avoir bénéficié d'une chance exceptionnelle grâce à la British Petroleum Company. Sans elle je n'aurais pas eu la possibilité de préparer une thèse dans des conditions aussi favorables. "L'intendance suivra ! ..." et elle a toujours suivi : qu'elle soit remerciée en premier lieu !

Je remercie Monsieur Jékisiel Szulmajster qui a bien voulu m'accueillir au sein du laboratoire d'enzymologie du C N R S et Messieurs Pierre Schaeffer, Jean-Claude Patte et Georges Cohen qui ont accepté d'examiner et de juger ce travail.

Il m'est agréable d'exprimer ma profonde gratitude à Madame Huguette Szulmajster qui m'a prodigué, tout au long de ce travail : conseils, soutiens ou critiques ; ceux-ci furent toujours de précieux stimulants et m'ont permis de progresser. J'aimerai me souvenir de son enthousiasme communicatif et de sa tenacité.

Au cours de ce travail, qui fut souvent oeuvre de collaboration, j'ai toujours obtenu le meilleur de tous ceux dont j'ai eu besoin. J'ose espérer leur avoir rendu, dans une certaine mesure, le meilleur de moi-même mais je pense leur être beaucoup redevable : je les remercie cordialement.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547107_0006

"Or il est un royaume noir, et que les yeux de l'homme évitent, parce que ce paysage ne les flatte point. Cette ombre de laquelle il prétend se passer pour décrire la lumière, c'est l'erreur avec ses caractères inconnus, l'erreur qui, seule pourrait témoigner à celui qui l'aurait envisagée pour elle-même, de la fugitive réalité. Mais qui ne saisit que le visage de l'erreur et celui de la vérité ne sauraient avoir des traits différents ? L'erreur s'accompagne de certitude. L'erreur s'impose par l'évidence. Et tout ce qui se dit de la vérité, qu'on le dise de l'erreur : on ne se trompera pas davantage. Il n'y aurait pas d'erreur sans le sentiment même de l'évidence. Sans lui on ne s'arrêterait jamais à l'erreur.

J'en étais là de mes pensées, lorsque, sans que rien en eût décelé les approches, le printemps entra subitement dans le monde"

Louis Aragon
(Le Paysan de Paris)

"Car la crainte est de l'homme
l'héréditaire et foncier
sentiment ; la crainte explique
tout, péché héréditaire,
héréditaire vertu. De la crainte
naquit aussi "ma" vertu, laquelle
se nomme : "science".

Friedrich Nietzsche
(Ainsi parlait Zarathoustra)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

Le problème étudié, ses relations avec les études de la régulation de la biosynthèse de la méthionine chez <i>Sacch.cerevisiae</i>	p. 4
--	------

Le problème étudié, ses relations avec les études de la biosynthèse de divers acides aminés chez différents microorganismes	p. 9
---	------

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I.1 Milieux de culture	p. 16
I.2 Souches utilisées	p. 17
I.3 Conditions de culture	p. 18
I.31 Conservation des souches	p. 18
I.32 Précultures	p. 18
I.33 Cultures normales	p. 19
I.34 Cultures radioactives	p. 19
I.35 Cultures en limitation de méthionine : chemostats	p. 19
I.4 Techniques génétiques	p. 20
I.5 Techniques biochimiques	p. 20
I.51 Préparation des extraits bruts	p. 20
I.52 Dosage des protéines	p. 21
I.53 Dosages enzymatiques	p. 21
I.54 Préparation de produits non commerciaux	p. 22
I.55 Mesure des perméases	p. 23
I.56 Mesure de la concentration endocellu- laire de méthionine	p. 23
I.57 Mesure de la concentration intracellu- laire de S.adénosyl-méthionine libre ...	p. 27

CHAPITRE II : PRECISIONS APORTEES A L'ETUDE DE LA REGULATION DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE

II.1	Mode de régulation de la voie de biosynthèse de la méthionine	p. 29
II.2	Régulation du dernier enzyme de la voie de biosynthèse : la méthionine synthétase	p. 33
II.3	Conclusion	p. 38

CHAPITRE III : ETUDE DE DIVERS MUTANTS RESISTANT A L'ETHIONINE

III.1	Etude de quelques modifications entraînées par les mutations "eth 3-1", "sem 4-1", "eth 10-1"	p. 41
III.11	Origine des souches	p. 41
III.12	Physiologie de la résistance à l'éthionine	p. 43
III.13	Caractérisation génétique des souches étudiées	p. 43
III.14	Régulation de quelques enzymes de la voie de la méthionine	p. 47
III.15	Synthèse déréprimée de l'homocystéine synthétase et de l'A T P sulfurylase dans des conditions de limitation en méthionine	p. 50
III.16	Etude des t-RNA méthionine globaux ..	p. 55
III.17	Conclusions relatives à l'étude des trois gènes de résistance "sem 4-1" "eth 3-1", "eth 10-1"	p. 55
III.2	Résultats de l'étude des mutants au locus ETH 2	p. 57

CHAPITRE IV : CONCENTRATIONS ENDOCELLULAIRES EN METHIONINE LIBRE CHEZ DIFFERENTES SOUCHES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

IV.1	Etude de la souche sauvage de référence 4094 B sensible à l'éthionine. Méthode Microbiologique	p. 60
IV.11	Etude en milieu synthétique minimum ..	p. 60
IV.12	Etude en milieu synthétique additionné de méthionine	p. 62
IV.2	Mesure de la concentration endocellulaire en méthionine libre par la méthode radioactive: étude de la souche 4094 B	p. 72
IV.3	Etude de souches sensibles à l'éthionine et d'origines différentes	p. 75
IV.4	Etude des souches résistant à l'éthionine ..	p. 75
IV.41	Mutants résistants à teneur endocellulaire en méthionine légèrement plus élevée que celle observée chez les souches sensibles à l'éthionine	p. 77
IV.42	Mutants résistants à l'éthionine à teneur très élevée en méthionine endocellulaire	p. 79
IV.43	Mutants résistants ayant une teneur endocellulaire en méthionine analogue à celle observée chez les souches sensibles	p. 79
IV.44	Etude particulière des souches portant des mutations au locus ETH 2	p. 79
IV.45	Etude de la combinaison, au sein d'une même souche, de plusieurs mutations indépendantes conférant la résistance.	p. 80
IV.46	Etude de l'excrétion de méthionine par les souches à teneur élevée en méthionine libre endocellulaire	p. 84
IV.5	Conclusion	p. 85

CHAPITRE V : INTERET PHYSIOLOGIQUE ET ORIGINE DES TENEURS ELEVEES EN
METHIONINE DES MUTANTS RESISTANT A L'ETHIONINE

V.1	Intérêt physiologique des teneurs élevées observées chez les souches résistant à l'éthionine	p. 87
V.2	Signification des teneurs élevées en méthionine	p. 91
V.21	Comparaison du renouvellement de la méthionine endocellulaire chez 4094-B et chez 4094-B E 10	p. 93
V.22	Surproduction	p. 93
V.23	Accumulation	p. 99

CHAPITRE VI : ROLE DE LA S.ADENOSYL-METHIONINE DANS LE MECANISME DE
REGULATION

VI.1	Etude de la synthèse de l'homocystéine synthétase et de l'A T P sulfurylase de diverses souches cultivées en présence ou en absence de S.adénosyl-méthionine	p.104
VI.11	Souches 4094-B	p.104
VI.12	Souches 4094-B.S4, 199 M1.102, 4094-B.E 10	p.105
VI.2	Etude de la biosynthèse endocellulaire de méthionine chez différentes souches cultivées en présence de S.adénosyl-méthionine ..	p.107
VI.3	Cas particulier des souches portant la mutation de résistance "eth 3-1"	p.111
VI.4	Conclusion	p.113

<u>DISCUSSION - CONCLUSION</u>	p.114
--------------------------------------	-------

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p.121
----------------------------	-------

REGULATION DE LA VOIE DE
BIOSYNTHESE DE LA METHIONINE
CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE:

ASPECTS PHYSIOLOGIQUES

I N T R O D U C T I O N

Parmi les problèmes des industriels pétroliers intéressés par la fabrication de protéines alimentaires il en existait deux qui, en 1969 lors de notre entrée au laboratoire de Madame H. Szulmajster, pouvaient être éclairés par les travaux poursuivis par son équipe.

L'un d'eux concerne les procédés de culture des levures du genre Candida sur alcanes comme seule source de carbone : le métabolisme de ces microorganismes est intensément aérobie et entraîne une consommation élevée d'oxygène et par conséquent d'énergie pour transférer cet oxygène du milieu de culture à la cellule. Une connaissance approfondie du système respiratoire de ces levures permettrait de faire en sorte qu'il s'exerce dans des conditions optimales. Le fait que l'utilisation des Candida soit récente en fermentation industrielle, explique l'absence d'études scientifiques précises de leur métabolisme. Par contre, Saccharomyces cerevisiae, levure de panification et de brasserie a été bien étudiée et de nombreux résultats expérimentaux font mieux comprendre son métabolisme général et son métabolisme respiratoire. Y. Surdin-Kerjan et coll. avaient étudié l'induction d'un enzyme respiratoire - la cytochrome oxydase - chez des souches de Sacch.cerevisiae auxotrophes pour la thréonine et la méthionine (1969). Nous avons continué cette étude sous son aspect physiologique, les aspects génétique et métabolique ayant été abordés par les auteurs cités. Les résultats obtenus nous ont conduit à éliminer les hypothèses émises et à proposer une explication générale des phénomènes observés. Malheureusement la solution trouvée rendait inutile la poursuite de ce travail. Celui-ci a donc été abandonné : nous avons résumé, dans un chapitre annexe, le travail réalisé et les conclusions obtenues.

Le second problème a trait à l'amélioration de la qualité alimentaire des levures cultivées sur alcanes. On sait qu'une alimentation insuffisante et principalement composée de céréales, comme c'est le cas dans les pays en voie de développement, aboutit à des carences en acides aminés indispensables à l'homme. Les protéines d'origine animale peuvent pallier ces déficiences mais des estima-

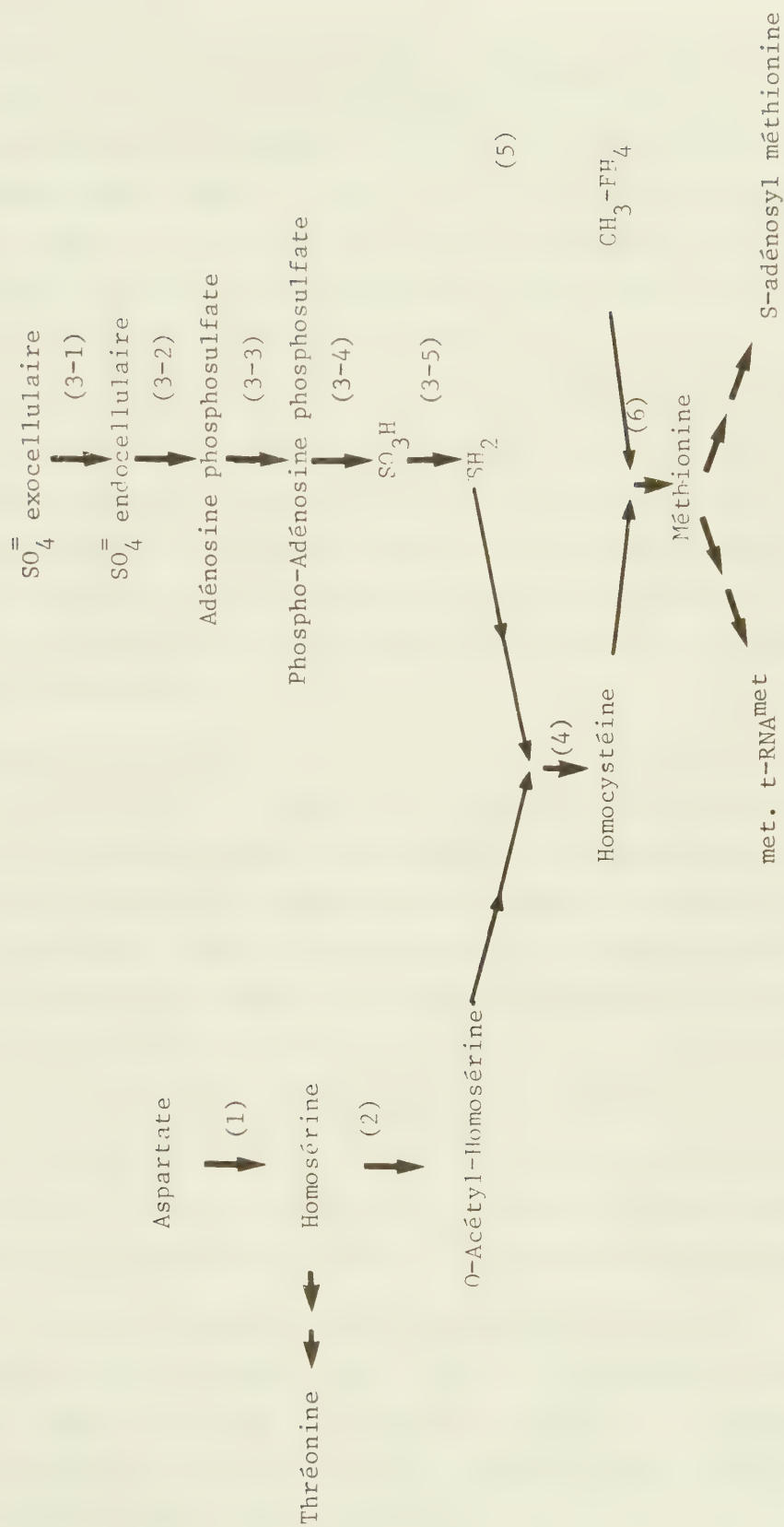
tions politiques et économiques démontrent l'insuffisance de la source agricole qui permettrait de faire face à un tel besoin. Divers projets de culture de microorganismes (Bactéries - Champignons Levures) à partir de substrats économiques (normales paraffines-méthane) ont été mis à l'étude afin de produire des protéines aptes à compenser, d'une part, le déséquilibre entraîné par l'emploi des protéines végétales et, d'autre part, le déficit quantitatif dû à l'utilisation des protéines d'origine animale : les progrès de la technologie des fermentations, la vitesse de reproduction de ces microorganismes permettent de produire rapidement d'énormes quantités de matière vivante. Les protéines issues de levures cultivées sur alcanes peuvent équilibrer une ration alimentaire à base de céréales mais quelques acides aminés indispensables demeurent en quantité insuffisante dans ces protéines. On peut, bien entendu, envisager de les ajouter à la ration alimentaire après synthèse chimique ou biologique séparée. Mais on peut également songer à cultiver des souches de levures perturbées dans certaines de leurs régulations et qui de ce fait surproduiraient les acides aminés préalablement reconnus insuffisants : ce procédé éviterait leur synthèse séparée et pourrait donc être à la fois plus économique et plus simple. Il est donc utile de connaître, afin de pouvoir les modifier, les systèmes de régulation des biosynthèses des acides aminés chez les Candida. Toujours pour les raisons évoquées plus haut, ces levures sont peu connues ; il a semblé judicieux d'effectuer l'étude des régulations des biosynthèses chez Sacch.cerevisiae afin d'être à même d'en appliquer les méthodes à Candida. Le laboratoire de Madame Szulmajster était indiqué puisqu'on y étudie la voie de biosynthèse de la thréonine et de la méthionine chez Sacch. cerevisiae. Nous nous sommes donc joint à ce projet de recherches afin d'y apporter une contribution et d'y gagner une expérience utilisable dans l'application aux problèmes de microbiologie appliquée.

Le problème étudié, ses relations avec les études de la régulation de la biosynthèse de la méthionine chez *Sacch.cerevisiae*.

La biosynthèse de la méthionine chez *Sacch.cerevisiae* s'effectue par une série de réactions biochimiques ordonnées de la façon suivante (voir également tableau 1, p. 5) :

- 1 - Réactions de synthèse du squelette carboné de la méthionine : ces réactions, à partir de l'aspartate, aboutissent à la fabrication de l'homosérine qui sert également de précurseur à la biosynthèse de la thréonine (voie branchée).
- 2 - Acétylation de l'homosérine en O-acétyl-homosérine catalysée par l'homosérine-O-transacétylase (2).
- 3 - Une série de réactions permettant de concentrer le sulfate à l'intérieur de la cellule et de le réduire en sulfure.
Ces réactions sont catalysées par :
 - (3-1) la sulfate perméase.
 - (3-2) l'A T P sulfurylase.
 - (3-3) l'Adénosine phospho-sulfate kinase.
 - (3-4) la phospho adénosine phospho sulfate réductase.
 - (3-5) la sulfite réductase.
- 4 - Formation de l'homocystéine à partir du sulfure et de l'O-acétylhomosérine catalysée par l'homocystéine synthétase (4).
- 5 - Synthèse des composés tétrahydrofoliques qui aboutit à des dérivés polyglutamylés de l'acide 5-méthyltétrahydrofolique. Cette voie métabolique et surtout les régulations qui pourraient l'affecter sont très peu connues chez la levure.
- 6 - Fixation du méthyle du composé tétrahydrofolique sur l'homocystéine par la méthionine synthétase.

TABLEAU I



L'étude d'une souche de Saccharomyces cerevisiae résistant à l'éthionine, et celle d'une souche thermosensible portant une mutation non létale du gène codant la méthionyl-t-RNA synthétase (MTS) avait permis à Cherest et coll. (1971) de formuler des hypothèses concernant la régulation de la voie de biosynthèse de la méthionine. L'étude de la souche déficiente en MTS avait, en effet, amené les auteurs à établir une corrélation entre le niveau de répression de trois enzymes de la voie de biosynthèse de la méthionine (Homocystéine synthétase (4) - ATP sulfurylase (3-2) - sulfite réductase (3-5)) et le taux de charge du t-RNA^{met} global. L'examen de la souche sauvage avait suggéré que seule une espèce mineure de méthionyl-t-RNA^{met} pouvait être impliquée dans la régulation de la voie de biosynthèse de la méthionine en tant que co-répresseur : la recherche de cette espèce mineure régulatrice a donc été entreprise au sein du laboratoire.

"ETH2", locus dont une mutation étudiée - eth2.1 - confère aux souches qui la portent une résistance à l'éthionine et une modification de la répressibilité des trois enzymes qui viennent d'être cités ainsi que de l'homosérine-O-transacétylase (enzyme 2 du tableau 1, p. 5) pouvait être le gène de structure de l'apo-répresseur ou du t-RNA^{met} régulateur. M. Masselot a étudié génétiquement le locus "ETH2" et a pu isoler une mutation non sens, "eth.2.2", suppressible par des supprimeurs "ochre". Dans l'état actuel de nos connaissances, ce fait permet de penser que le produit du gène "ETH2" est bien une protéine : celle-ci pourrait donc jouer le rôle de l'apo-répresseur dans un schéma classique de répression. La possibilité pour "ETH2" d'être le gène de structure du t-RNA^{met} est, par conséquent, éliminée.

Parmi le grand nombre d'enzymes impliqués dans cette voie complexe de biosynthèse seuls quatre d'entre eux avaient été étudiés lors des travaux précités. Il convenait d'étendre les recherches aux autres enzymes afin de vérifier si les modifications entraînées par la mutation "eth2.1" sur la régulation de synthèse de ces quatre enzymes s'appliquaient également aux autres enzymes. M. C. Lhomond et

Y. Surdin-Kerjan ont examiné les enzymes de la voie d'assimilation du sulfate (sulfate perméase (3-1) - Adénosine phosphosulfate kinase (3-3)), et nous avons apporté quelques précisions à l'étude de la régulation de la méthionine synthétase.

Etant donné l'existence de nombreux mutants sélectionnés de façons différentes pour leur résistance à l'éthionine nous nous sommes demandés si ces mutants étaient allèles au même locus "ETH2" et si les modifications entraînées par ces mutations au niveau de la régulation de la chaîne de biosynthèse de la méthionine étaient comparables. Nous avons donc entrepris avec la collaboration de H. Cherest, Y. Surdin-Kerjan et M. Masselot l'étude biochimique et génétique de plusieurs mutants résistant à l'éthionine afin d'apporter une réponse à ces questions.

Il s'est avéré que chacune des mutations indépendantes étudiées pouvaient perturber la régulation de la voie de biosynthèse de la méthionine.

Nous avons testé l'hypothèse, formulée par H. Cherest (1970), concernant le mécanisme de résistance à l'éthionine : "une élévation de la teneur endocellulaire en méthionine libre pourrait expliquer la résistance de certains mutants". Les mécanismes de transport actif de la méthionine permettent de concentrer l'acide aminé ou son analogue à l'intérieur de la cellule. Les affinités respectives des enzymes pour l'acide aminé et son analogue déterminent, lorsque ces deux composés sont présents simultanément dans la cellule, l'utilisation de l'un d'eux comme substrat. Que la méthionine soit en excès et l'effet toxique de l'éthionine sera moindre : ceci se produit quand la méthionine est ajoutée à une culture intoxiquée par l'éthionine. Il se produirait le même phénomène si la teneur intracellulaire en méthionine de la souche résistante était supérieure à celle de la souche sensible : cette élévation de la teneur endocellulaire en méthionine résulterait des perturbations apportées au système de régulation par certaines mutations de résistance. Nous avons donc mesuré la concentration endocellulaire de méthionine libre chez diverses souches résistantes ou

sensibles à l'éthionine cultivée dans différentes conditions. Nous avons par la suite tenté d'expliquer la teneur élevée en méthionine des souches résistantes et montré que celle-ci permet de lutter contre la chute brutale de la teneur endocellulaire de méthionine provoquée par l'addition de l'éthionine à la culture d'une souche sauvage sensible ou d'une souche résistante. Cette concentration élevée en méthionine endocellulaire semble due à une surproduction dans la chaîne de biosynthèse bien que le mécanisme de cette production accrue soit pour l'instant difficilement explicable : dans cette voie de biosynthèse, la dérégulation de la synthèse d'un ou plusieurs des enzymes étudiés n'a pas été observée spontanément chez les mutants de régulation.

Nous avons montré que la régulation de la chaîne de biosynthèse dans son ensemble doit s'opérer essentiellement par un mécanisme de répression, les phénomènes de rétro-inhibition n'étant pas décelables.

Chez certains mutants la teneur élevée en méthionine s'accompagne d'une absence d'accumulation de S-adenosyl-méthionine. Ceci nous a conduit à reconsidérer le rôle de la S-adenosyl-méthionine dans le système de régulation de la voie de biosynthèse de la méthionine et à proposer une version modifiée du schéma de régulation où méthionyl-tRNA^{met} et S-adenosyl-méthionine interviennent de façon complexe.

Quelle que soit l'hypothèse retenue ultérieurement pour expliquer la régulation et les mécanismes qui assurent la surproduction endocellulaire de méthionine chez certains mutants, les résultats obtenus montrent qu'il existe des souches à teneur endocellulaire élevée en méthionine parmi les mutants sélectionnés pour leur résistance à l'éthionine ou à la sélénométhionine. Par conséquent, des procédés de sélection analogues doivent être applicables aux Candida et permettre ainsi d'obtenir, au moins en ce qui concerne la méthionine, des souches répondant aux critères que nous nous étions fixés au départ.

Le problème étudié, ses relations avec les études de la régulation de la biosynthèse de divers acides aminés chez différents microorganismes.

La recherche du composé chimique susceptible de jouer le rôle de co-répresseur dans la voie de biosynthèse de la méthionine chez Sacch.cerevisiae, s'inscrit dans les travaux sur la régulation de la biosynthèse des acides aminés. C'est en 1964 que Schlessinger et Magasanik avancèrent l'hypothèse du rôle co-répresseur de l'histidinyl-t-RNA^{his} dans le mécanisme de régulation de la voie de l'histidine chez Aerobacter aerogenes et E.coli. Les travaux de Neidhart (1965) concernant le rôle de la valyl-t-RNA synthétase chez E.coli avaient conduit cet auteur à insister sur le rôle plausible des enzymes activateurs des acides aminés et des amino-acyls-t-RNA dans la régulation (1966). Depuis, certains systèmes de régulation ont fait l'objet d'une étude approfondie et les travaux réalisés sont venus apporter confirmations ou réserves à ces hypothèses.

Le mieux connu des systèmes est celui de la régulation de la voie de l'histidine chez Salmonella typhimurium, étudié par B.N. Ames et ses collaborateurs. On sait, depuis Hartman et coll. (1960) que les gènes de structure des enzymes de cette voie biosynthétique constituent un opéron. L'utilisation d'un analogue toxique de l'histidine (le 1,2,4-triazole-3-alanine) a permis d'isoler des mutants de régulation. Les premiers travaux du groupe de Ames, concernant ces mutants, avaient montré que :

- 1) Les mutants "his S" - modifiés dans leur histidinyl-t-RNA synthétase - présentaient un phénotype déréprimé (J.R. Roth et B.N. Ames, 1966). J.A. Lewis et B.N. Ames (1972) ont établi la corrélation entre la dérépression de l'opéron histidine, (de l'ordre de 8,5) et la quantité réduite d'histidinyl-t-RNA^{his} (12% du t-RNA^{his} est chargé in vivo chez la souche "his S" contre 77% dans les mêmes

conditions, chez la souche sauvage, en milieu synthétique minimum). L'addition d'histidine au milieu de culture rétablit chez les souches "his S" un taux de charge comparable à celui qu'on observe chez le sauvage dans les mêmes conditions ainsi qu'une croissance normale et provoque la répression de la transcription de l'opéron histidine.

- 2) Les mutants "his R" - caractérisés également par un phénotype déréprimé - ont un niveau absolu de t-RNA^{his} égal à 50% du niveau observé chez la souche sauvage (Silbert et coll., 1966). Brenner et coll. (1972) ont montré que "his R" est une mutation du gène de structure du t-RNA^{his} mais cette mutation n'a aucune influence sur le taux de charge du t-RNA^{his} (J.A. Lewis et B.N. Ames 1972).

Dans cette dernière publication, sont également examinées les modifications observées chez les souches appartenant à 4 autres classes de mutants de régulation : "his W", "his U", "his O", et "his T". Les souches des deux premières catégories - "his W" et "his U" - montrent une quantité absolue de t-RNA^{his} inférieure à celle observée chez la souche sauvage, les taux de charge étant cependant analogues : on retrouve toujours la corrélation établie lors de l'étude des mutants "his R", "his S", entre la dérépression de l'opéron histidine et la baisse du niveau d'histidinyl-t-RNA^{his}. Les niveaux de t-RNA^{val} et de t-RNA^{arg} sont également abaissés : les auteurs avancent l'hypothèse selon laquelle les mutations "his W" et "his U" entraîneraient des modifications d'enzymes impliqués dans la maturation des t-RNA. L'étude des souches portant la mutation "his O" n'apporte rien dans l'optique étudiée puisque celles-ci possèdent un niveau et un taux de charge normal de t-RNA^{his}. Fink et Roth (1971), Fankhauser et coll. (1971) ayant montré que ces mutations étaient

situées au niveau du gène opérateur, la dérégulation s'explique aisément par l'absence d'affinité du répresseur pour l'opérateur modifié (il est intéressant de noter que les niveaux de dérégulation obtenus à partir de différentes mutations "his O" sont variables mais peuvent atteindre des niveaux qu'aucune autre mutation de régulation n'est susceptible d'entraîner). Enfin ces mutations "his T" fournissent un exemple remarquable de modifications de la structure du t-RNA^{his} dans la région de l'anticodon, modifications qui- sans retentir sur la synthèse protéique- perturbent la régulation puisque les souches les portant sont de phénotype dérégulé. L'obtention de mutations non-sens dans le gène "his T" montre, dans l'état actuel de nos connaissances, que ce gène ne commande pas la structure du t-RNA^{his} (Chang et coll., 1971) : la protéine fabriquée par "his T" n'apparaît pas essentielle à la vie de la cellule et les auteurs supposent qu'elle servirait à modifier plusieurs espèces de t-RNA différentes qui pourraient ensuite jouer leur rôle dans la régulation des voies où elles sont impliquées. De plus, ils n'excluent pas que cette modification subtile du t-RNA^{his} pourrait engendrer une combinaison his-t-RNA^{his} - his-t-RNA synthétase impropre : ceci les conduit à supposer que l'histidinyl-t-RNA associé à la his-t-RNA synthétase jouerait le rôle de co-répresseur.

Les travaux de R.D. Mosteller et C. Yanofsky (1971) sur la régulation de la voie de biosynthèse du tryptophane chez E.coli aboutissent à des conclusions différentes de celles des auteurs précédents. La limitation en tryptophane d'une souche possédant une tryptophanyl-t-RNA synthétase modifiée, entraîne une décharge du t-RNA^{trp} et une dérégulation de l'opéron tryptophane. L'addition de tryptophane, ou de 4-méthyltryptophane, ou de 6-méthyltryptophane à cette culture carencée a pour conséquence la recharge du t-RNA^{trp} par le tryptophane seulement, les autres analogues n'étant pas chargés, cependant que la transcription de l'opéron tryptophane est réprimée par les différents produits. L'aspect cinétique des expériences effectuées avec le tryptophane est encore plus révélateur : le t-RNA^{trp} est rechargé après que les transcriptions du mRNA-tryptophane aient cessé. Les auteurs

concluent que le $\text{trp-t-RNA}^{\text{trp}}$ ne joue pas le rôle de co-répresseur et que même l'hypothèse de l'action d'un tryptophanyl-t-RNA mineur de régulation ne peut être envisagée puisque un tel $\text{t-RNA}^{\text{trp}}$ devrait être chargé dans des conditions où le t-RNA réservé à la synthèse protéique serait déchargé.

L'intervention des amino-acyls-t-RNA en tant que co-répresseur dans le mécanisme de régulation et le rôle des amino-acyls-t-RNA synthétases semblent opposées dans ces différents systèmes .

La situation n'est guère plus claire dans la régulation de la biosynthèse de la méthionine chez E.coli et Salmonella typhimurium où apparaît un nouveau candidat au rôle de co-répresseur : la S-adénosylméthionine. Les gènes de structure des enzymes de la voie de la méthionine ne sont pas organisés en un opéron mais des groupes de gènes sont disséminés sur le chromosome bactérien. Chez S.typhimurium des souches portant des mutations de gènes de régulation ont été isolées - ce sont les souches portant les mutations "met J" et "met K" - ainsi que des souches portant des mutations de méthionyl-t-RNA synthétase et désignées par "met G". Les souches portant "met G" (Gross et Rowbury, 1969-1970) se caractérisent par une répressibilité normale des enzymes de la voie : les auteurs éliminent l'intervention du méthionyl-t-RNA^{met} en tant que co-répresseur dans la régulation puisque la corrélation trouvée plus haut n'existe pas ici. Les mutants "met J" de S.typhimurium surproduisent et excrètent de la méthionine : la mutation "met J" introduite dans un génome contenant déjà "met G" supprime le phénotype déterminé par cette dernière mutation. Selon les auteurs, "met J" serait le gène de structure de l'apo-répresseur. Les mutants "met K" du même microorganisme, sont de différentes catégories : les uns, surproduisant de la méthionine et donc "supprimant" le phénotype "met G", les autres, n'en surproduisant pas : tous résistent aux analogues. Les études réalisées avec des souches d'E.coli portant des mutations non localisées (Greene et coll., 1970) ont montré que ces souches, de phénotypes déréprimés, étaient déficientes en S-adénosylméthionine synthétase. Ces résultats conduisent Smith (1971) à considérer, par analogie, que les mutations "met K" de S.typhimurium

pourraient entraîner des déficiences en S-adenosylméthionine synthétase. Gross et Rowbury n'ont pourtant pas trouvé de telles déficiences chez les souches "met K" de S.typhimurium (d'après Smith, 1971). Que "met K" soit, chez S.typhimurium, le gène de structure de la S-adenosylméthionine synthétase reste donc encore à démontrer. Cependant, l'étude des souches d'E.coli déficientes en S-adenosylméthionine synthétase suggère l'importance du rôle de la S-adenosylméthionine dans la régulation : la mise au point du dosage de la S-adenosylméthionine synthétase et l'étude précise de cet enzyme permettront de mieux définir son rôle et celui de son produit (Smith, 1971). M.A. Savin et coll. (1972) ont récemment confirmé que les souches de S.typhimurium portant les mutations "met K" ou "met J" n'étaient pas déficientes en S-adenosylméthionine synthétase.

Chez les Eucaryotes, ces problèmes ont été abordés avec des préoccupations analogues. Nazario et coll. (1971) ont montré que des souches de Neurospora crassa - déficientes en tryptophanyl-t-RNA synthétase - étaient déréprimées dans la synthèse des enzymes de la voie (en particulier l'anthranilate synthétase et la tryptophane synthétase). On observe toujours la même corrélation entre un fonctionnement défectueux de la trp-t-RNA synthétase (dont la conséquence est un mauvais taux de charge du t-RNA^{trp}) et une dérépression de la synthèse des enzymes de la voie. Cette corrélation permettrait d'impliquer le trp-t-RNA^{trp} dans la régulation chez Neurospora crassa contrairement à ce qu'on a vu plus haut pour E.coli.

Les résultats obtenus par Wiame et coll. (1970) permettent de conclure à l'existence de 3 gènes de régulation qui interviennent en même temps dans la régulation de l'anabolisme et du catabolisme de l'arginine. Une seule mutation en un seul de ces trois gènes - arg RI, arg RII ou arg RIII entraîne la résistance à la canavanine, la dérépression de synthèse de l'ornithine transcarbamylase en milieu synthétique, l'absence de répressibilité de la synthèse du même enzyme après culture en présence d'arginine et l'incapacité d'induire l'arginase qui catalyse la dégradation de l'arginine : ces caractères sont opposés à ceux manifestés par la souche sauvage. Selon les auteurs,

ces gènes coderaient chacun une chaîne peptidique faisant partie d'un apo-répresseur hétéropolymérique, lequel interviendrait de façon négative dans la régulation de l'anabolisme et de façon positive dans la régulation du catabolisme (Wiame, 1972). Ce groupe de travail n'a pas étudié le rôle de l'arginyl-t-RNA.

Ce rapide exposé de quelques travaux, en cours dans le domaine de la régulation, montre comment les études de l'équipe de H. de Robichon-Szulmajster s'inscrivent dans cet ensemble et permettra de situer les résultats que nous allons maintenant exposer.

-:-:-:-:-:-:-:-

Etant donné que les expériences que nous avons effectuées font partie d'un travail d'équipe, il est difficile de dissocier certains résultats obtenus en commun. D'autre part, des résultats obtenus dans le laboratoire en même temps que nos propres expériences viennent compléter ces dernières ou étayer la discussion. Quand ces résultats sont utilisés les auteurs les ayant obtenus sont cités dans l'exposé.

CHAPITRE I

MATERIEL et METHODES

Tous les milieux, en cas de nécessité, sont solidifiés par addition d'agar Difco à raison de 30 grammes par litre.

- Milieu de sporulation : Extrait de levure Difco 2,5g
Glucose 1 g
Acétate anhydre de potassium
0,1M pH 6,9 : 1000 ml

1.2. Souches utilisées. Nous avons utilisé les souches suivantes :
- 4094-B de génotype $\propto$, ade 2, ura 1, sensible à l'éthionine et venant de la collection de F. Sherman.

- des souches dérivées de cette souche par mutation entraînant la résistance à la sélénométhionine ou à l'éthionine. Ce sont :
 - 4094-B 6
 - 4094-B.E. 10
 - 4094-B.S. 4
 - 4094-B.S. 13
- des souches, dérivées également de 4094-B à la suite de croisements effectués dans le laboratoire, portant une ou plusieurs mutations de résistance et qui seront signalées au fur et à mesure dans le texte :
 - C C 17.6 A - C C 146.6 A - C H 82.7 D
 - C H 7 1. 5 A
 - C Y 16. 10 C
 - C J 1. 1 A - C J 1. 2 B - C J 21. 6 A - C J 21. 11 B -
- 199 M 1 de génotype $\propto$, trp 1, arg 4, his 5, lys 1, ade 2, leu 1, sensible à l'éthionine, provenant de la collection de P. Meuris.
 - des souches dérivées de celle-ci par mutagenèse à l'acide nitreux ou à l'éthyl-

methane sulfonate ou par croisements effectués par M. Masselot. Ce sont des souches résistant à l'éthionine :

199 M1. 102 - 199 M1. 21

C M 53. 24 C - C M 53. 6 A

- C M 8. 34 D de génotype a, trp 1, ura 4, ade 5-7, leu 2, iso 1, sensible à l'éthionine,

- C M 8.15 B de génotype a, ura 1, ade 5-7, leu 2, iso 1, sensible à l'éthionine, souches construites par M. Masselot.

- et des souches dérivées par mutagenèse à l'éthyl-méthane sulfonate ou au 5 bromouracile résistant à l'éthionine :

C M 8 . 34 D. 103

C M 8 . 15 B. 1

C M 8 . 15 B. 2

- des souches de la collection de M. Grenson, auxotrophes pour la méthionine.

D 6 - D 73 - D 38

- une souche de M. Bourgeois : B 2 auxotrophe pour la méthionine.

- enfin 3 souches sauvages, sensibles à l'éthionine,

S 288 C - collection R.K. Mortimer

P M 100 - collection P. Meuris

264.2 B - collection M. Luzzati

1.3. Conditions de culture

1.31 - Conservation des souches : Les différentes souches utilisées sont conservées à 4°C en petits tubes de milieu YPGA solidifié.

1.32 - Précultures : A partir de ces tubes de conservation, des inocula sont préparés par culture dans des tubes à essais stériles

contenant 10 ml du milieu YPGA liquide. Ces tubes sont incubés et agités à 28°C pendant une nuit. Les cellules de ces précultures sont alors centrifugées et lavées stérilement deux fois à l'eau distillée stérile.

1.33 - Cultures normales : Les milieux contenus dans des fioles, type Fernbach de 2 litres, (contenant 1 litre de milieu) sont ensemencés, à l'aide des cellules lavées, à raison de 2 à 20 mg de cellules poids sec par litre de milieu (une relation densité optique - à 650 nm. sous 1 cm de trajet optique - densité cellulaire a été établie).

Les cellules sont récoltées après une nuit d'incubation à 28° sous agitation. La densité cellulaire choisie pour la récolte est de l'ordre de 300 mg de cellules poids sec par litre (la phase exponentielle n'est pas terminée).

1.34 - Cultures radioactives : Elles sont réalisées dans les mêmes conditions mais les milieux G.21 sont modifiés dans leur teneur en $\text{SO}_4^{=}$ ce qui évite une dilution isotopique trop importante du ^{35}S ajouté à raison de 0,5 à 1mCi pour 100 ml de culture. La molarité en sulfate du milieu G 21 est 20 mM. On peut, sans affecter trop la croissance de la levure, descendre jusqu'à une teneur de 0,2 mM de sulfate. Nous avons choisi une teneur intermédiaire de 0,5 mM ce qui permet d'obtenir des radioactivités spécifiques de 5.10^7 coups par minute et par micromole de sulfate.

1.35 - Cultures en limitation de méthionine : chemostat : Les principes de telles cultures ont été définis par Novick et Szilard (1950) et par Monod (1950). Nous avons réalisé un dispositif ayant les caractéristiques techniques suivantes :

Vase de culture :-Volume :3 litres-1 litre de milieu.

- aéré et agité par de l'air traversant un diffuseur.
- agité par un barreau magnétique entraîné par un agitateur magnétique.
- récolte par débordement à travers un diverticule fixant et maintenant le volume de la culture à 1 litre.

Les cellules sont recueillies dans des flacons maintenus au froid dans des récipients isothermes remplis de glace pilée.

- Milieu frais amené d'une nourrice de 10 litres par des micropompes F.A. Hughes série II, 100 t/min, avec réducteur 5/1 ; corps de pompe longue course avec tête de pompe n° 2 permettant d'obtenir par l'utilisation ou non du réducteur des débits de 20 ml/heure à 750 ml/heure.

La levure ayant un temps de génération de l'ordre de trois heures, on peut évaluer par le calcul - voir Monod (1950) - le taux de dilution maximum qu'il serait possible de pratiquer en turbidostat : il serait de 0,2, soit un débit de milieu frais de 200 ml/heure/litre de culture. On sait que la limitation, en chemostat, dépend de la valeur du taux de dilution : nous avons réglé le débit entre 40 ml/heure/litre de culture et 80 ml/heure/litre de culture entraînant des taux de dilution de 20 à 40% de la valeur du μ maximum. Comme les souches utilisées étaient généralement auxotrophes pour plusieurs facteurs, nous avons pris soin de vérifier que le facteur limitant était bien la méthionine. En conservant les taux de dilution limitants cités, nous avons doublé la concentration de tous les ingrédients du milieu nourricier, exceptée celle de la méthionine. La densité cellulaire restant identique à celle obtenue en présence de quantités normales permet d'affirmer que la limitation était bien le fait de la méthionine. Des mesures de concentrations endocellulaires de méthionine libre, au cours du chemostat, sont venues confirmer cette conclusion.

1.4. Techniques génétiques : La formation des diploïdes, l'isolement des ascospores et l'analyse des tétrades ont été réalisés selon Johnston et Mortimer (1959).

1.5. Techniques biochimiques

1.51 - Préparation des extraits bruts: Après récolte, les cellules sont lavées et centrifugées deux fois soit avec du tampon tris HCl

0,1 M pH 7,5 soit avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7,5. Le choix du tampon est déterminé par les enzymes qui seront dosés dans l'extrait brut. Le culot final est mis en suspension dans trois fois son volume du tampon choisi et additionné d'un poids de billes de verre (Braün 0,10 mm. 0,11 mm $\varnothing$) égal à 4 fois son poids. Les cellules sont alors broyées dans un broyeur à billes (Braün) en veillant à ce que la température lors de l'opération se maintienne proche de 0° (injection de neige carbonique). Le broyage dure 15 secondes à la vitesse 1 et 45 secondes à la vitesse 2 du broyeur - Les débris cellulaires et les billes sont éliminés par 20 minutes de centrifugation à 17000 g. Le surnageant est conservé soit congelé soit dans la glace jusqu'à mesure des activités enzymatiques.

1.52 - Dosage des protéines. Celles-ci sont dosées, par référence à une gamme de sérum-albumine, par la méthode au biuret de Stickland (1951).

1.53 - Dosages enzymatiques. Les activités spécifiques sont exprimées en nanomoles de substrat transformé par minute et par mg de protéine .

Aspartokinase : A T P L-aspartate-4-phosphotrans-
férase
E.C.2.7.2.4
dosée selon Stadtmann et coll.(1961)

Aspartate semi-aldéhyde deshydrogénase: L-aspartate B
semi-aldéhyde-deshydrogénase : NADP oxydoréductase
(phosphorylante) E.C.1.2.1.11.
dosée selon la méthode Black et Wright(1955)
modifiée par Surdin-Kerjan (1967)

Homosérine deshydrogénase : L.Homosérine : N A D oxydo-
réductase E.C.1.1.1.5.
dosée selon la méthode de Wright (1955)

Homocystéine synthétase : dosée selon Wiebers et Garner (1967) mais l'incubation se fait à 30° au lieu de 37°. L'homocystéine formée est dosée selon Kredich et Tomkins (1966).

Adénosine triphosphate sulfurylase : A T P : sulfate adénylyl transferase E.C.2.7.7.4. dosée selon la méthode de Wilson et Bandurski (1958) dans les conditions décrites par de Vito et Dreyfus (1964). Le phosphate inorganique, libéré par l'hydrolyse du pyrophosphate (catalysée par la pyrophosphatase présente normalement dans les extraits bruts) est dosé par la méthode de Fiske et Subbarow (1925).

Méthionine synthétase : dosée selon Botsford et Parks (1967). Le dosage microbiologique de la méthionine synthétisée a été réalisé avec Leuconostoc mesenteroides selon la technique décrite plus loin. Le dosage enzymatique réalise, in vitro, la réaction de fixation du méthyle des composés tétrahydrofoliques sur l'homocystéine, la régénération des méthyl-tétrahydrofolates est assurée, pendant la réaction, avec la sérine comme donateur de radicaux $\text{CH}_2\text{-OH}$ qui seront ultérieurement réduits : dans ces conditions une incapacité à régénérer les méthyltétrahydrofolates conduirait également à un dosage négatif.

Méthionyl-t-RNA synthétase - extraction des t-RNA - mesure du taux de charge in vivo. Mesure de l'activité acceptrice des t-RNA. Les méthodes employées ont été décrites par Cherest et coll. (1971).

1.54 - Préparation de produits non commerciaux. L-aspartate semi-aldéhyde a été préparé par Y. Surdin-Kerjan selon la méthode de Black et Wright (1955).

La D L O.acétylhomosérine a été préparée par M. Cherest selon une technique identique à celle décrite pour l'O.acétylsérine par Sakami et Toennies (1942).

1.55 - Mesure des "perméases" : Se fait selon les méthodes décrites par Surdin et coll. (1965) avec des cellules non proliférantes et celles décrites par Grenson (1966) avec des cellules en croissance : dans les deux cas on utilise des acides aminés radioactifs. Ce terme "perméase" correspond à la capacité, observée chez la levure et d'autres microorganismes, de transport actif de métabolites. La capacité de concentration intracellulaire du métabolite à partir du milieu ambiant, la nécessité d'une source d'énergie pour accomplir ce transport, la spécificité stérique observée et l'existence de mutants déficients dans cette capacité de transport actif sont autant de propriétés que recouvre le terme "perméase" que nous emploierons dès maintenant dans un but de simplification. L'étude des teneurs endocellulaires de méthionine libre décrite ci-après, nous a permis également de mesurer physiologiquement les effets du phénomène de perméation de la cellule vis-à-vis de la méthionine.

1.56 - Mesure de la concentration endocellulaire de méthionine libre.

METHODE MICROBIOLOGIQUE

- A - La souche à tester est cultivée dans le milieu synthétique "YNB" glucosé additionné des différents facteurs d'auxotrophies éventuels. La mesure de la concentration endocellulaire de méthionine libre a été appliquée à des cellules, soit parvenues à un stade analogue à celui où les extraits bruts destinés

aux dosages enzymatiques sont effectués (donc au cours de la phase exponentielle), soit prélevées tout au long de la phase exponentielle jusqu'à l'entrée dans la phase de ralentissement, soit cultivées dans le milieu synthétique modifié par addition de méthionine à un moment donné de la phase exponentielle. Des précisions seront données au cours du chapitre correspondant à cette étude.

- B - Préparation des extraits acellulaires destinés à la mesure de la méthionine libre. Les cellules provenant de 1 litre de culture sont rapidement centrifugées (3' à 1000g). Le culot obtenu est remis en suspension dans l'eau distillée refroidie à 4° : il est lavé deux ou trois fois à l'aide de 100 ml d'eau distillée. Le culot lavé est de nouveau remis en suspension dans 10 ml d'eau distillée froide et cette dernière suspension est centrifugée dans des tubes coniques gradués de 12 ml. La masse cellulaire obtenue après cette dernière centrifugation occupe un volume de 2 ml quand la densité cellulaire de la culture est de 360 mg de cellules sèches par litre de culture. Ce dernier culot est de nouveau mis en suspension avec 10 ml d'eau distillée : 3 ml de la suspension sont utilisés pour mesurer par dessiccation le poids sec de cellules obtenues en les plaçant dans un bécher préalablement taré à 95° pendant 24 heures. Les 9 autres millilitres subissent une ébullition au bain-marie pendant dix minutes. A l'issue de ce traitement les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation : le surnageant ou "extrait bouilli" est alors soumis au dosage microbiologique de la méthionine. Des dosages de méthionine ont été également effectués sur les extraits bruts obtenus par la méthode décrite en 1.51 après précipitation des protéines solubles par

l'acide trichloracétique. Ces contrôles ont permis d'éliminer l'hypothèse d'une destruction partielle de la méthionine au cours de la préparation des extraits "bouillis" car les résultats obtenus n'étaient pas significativement différents.

- C - Dosage microbiologique de la méthionine : Il se fait selon la méthode de dosage des acides aminés décrite par F. Steele et coll. (1948).

La Société Difco prépare le milieu adéquat et précise son mode d'emploi. Il comporte :

1/ L'établissement d'une courbe-étalon à 650 nm :

Leuconostoc mesenteroides P 60, A T C C 8042 a un rendement dépendant linéairement de la quantité de L méthionine ajoutée au milieu, pourvu que cette quantité soit supérieure à $0,3\mu\text{g/ml}$ et inférieure à $2\mu\text{g/ml}$.

2/ Le calcul des quantités de méthionine présentes dans divers échantillons se fait à partir de cette courbe étalon pourvu que les quantités utilisées dans le test amènent à des concentrations situées entre $0,3\mu\text{g/ml}$ et $2\mu\text{g/ml}$. Nous avons vérifié que L.mesenteroides ne pousse pas à partir de S.adénosylméthionine ni d'homocystéine : il est strictement exigeant en méthionine.

3/ La détermination de la concentration de méthionine dans l'extrait bouilli qui permet alors, grâce au poids sec, de calculer les quantités présentes dans les cellules : on les exprime en micromoles de méthionine par gramme de cellules sèches. Le volume cellulaire correspondant à 1 gramme de cellules sèches est d'environ 4 cm^3

(chiffre calculé en assimilant la levure à une sphère de 5μ de diamètre et en évaluant le nombre de cellules, correspondant à 1 g de cellules sèches par comptage à l'hématimètre). Cette relation approximative permettra de calculer la molarité de la méthionine dans le milieu cellulaire.

Il est essentiel d'observer des conditions rigoureuses de stérilité durant ce test microbiologique.

METHODE RADIOACTIVE

Après culture dans les conditions décrites au paragraphe "cultures radioactives", on récolte les cellules par centrifugation. Elles sont ensuite lavées et traitées par ébullition à 100° durant 10 minutes.

L'extrait bouilli radioactif est recueilli après centrifugation et chromatographié en couche mince de gel de cellulose (M.N. 300, Macherey et Nagen). La migration des substances contenues dans l'extrait bouilli est obtenue à l'aide du solvant butanol, acide acétique, eau (respectivement 12-3 et 5 parts); un spot témoin de méthionine pure radioactive permet de situer la méthionine contenue dans l'extrait bouilli. Les plaques sont ensuite révélées photographiquement par des films Kodirex et les zones de cellulose correspondant à la méthionine sont grattées, recueillies et comptées dans un compteur à scintillation (Intertechnique). Le calcul permet de déterminer le nombre de micromoles de méthionine radioactive présentes dans la zone méthionine : il suffit de faire le quotient de la radioactivité mesurée dans cette

zone par l'activité spécifique du sulfate ^{35}S
présent au moment de l'inoculation de la culture.

1.57 - Mesure de la concentration intracellulaire de
S.adénosyl méthionine libre. La S.adénosyl méthionine a été
extraite des cellules par traitement à l'acide perchlorique
et dosée après chromatographie sur Dowex 50, Na^+ , selon la
méthode de SK. Shapiro et D.J. Ehrninger (1966).

C H A P I T R E I I

PRECISIONS APORTEES A L'ETUDE DE LA REGULATION
DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE

Deux aspects ont été abordés dans ce chapitre :

- 1/ le mode de régulation de la voie de biosynthèse de la méthionine,
- 2/ la régulation du dernier enzyme de la voie de biosynthèse : la méthionine synthétase.

II. 1 - MODE DE REGULATION DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE LA METHIONINE

Les résultats obtenus au laboratoire faisaient penser que la régulation par répression de la synthèse des enzymes devait être le mécanisme primordial. En effet, seul parmi les enzymes étudiés, l'homocystéine synthétase semblait sujette à une régulation par inhibition de son activité par la DL-méthionine alors que les autres enzymes étudiés étaient soumis seulement à une régulation par répression de leur synthèse. Des études complémentaires nous ont permis de montrer que l'inhibition de l'activité de l'homocystéine synthétase par la DL-méthionine était causée en réalité par la D-méthionine, la L-méthionine n'ayant qu'un effet mineur dans cette inhibition (voir tableau II-1 page 30). Cette inhibition ne pouvant pas avoir une importance physiologique, il restait toutefois possible que le fonctionnement d'autres étapes non étudiées pouvait être rétro-inhibé par la méthionine. Ceci nous a incités à effectuer des expériences permettant de conclure à l'absence de régulation par rétro-inhibition par la méthionine. Plutôt que d'étudier chacun des enzymes impliqués dans la voie de biosynthèse de la méthionine et de mesurer, in vitro, une inhibition éventuelle de leur activité par la méthionine nous avons préféré employer une méthode physiologique globale permettant d'éliminer les mécanismes d'inhibition dans la régulation de cette voie de biosynthèse. Cette méthode est basée sur les principes suivants : Si l'un des enzymes non étudiés est soumis à une telle inhibition, son activité décroîtra très rapidement dès l'addition de

TABLEAU II-1 - Inhibition de l'activité de l'homocystéine synthétase par la D, la L, ou la DL-méthionine chez la souche de *Saccharomyces cerevisiae* 4094-B

4094-B	D-méthionine					L-méthionine	DL-méthionine
	0	2	4	6	10		
Concentration en méthionine en mM	0					10	20
Pourcentage d'inhibition de l'activité en présence de méthionine en fonction du témoin sans méthionine	0	33	39	60	67	20	52
	0	27	45	52	62	-	-

méthionine au milieu de culture : les mécanismes de transport actif de la méthionine à l'intérieur de la cellule sont tels (Surdin et coll., 1965) que la teneur endocellulaire en méthionine atteint très vite des valeurs élevées susceptibles d'avoir une action inhibitrice: dans ce cas la biosynthèse endocellulaire de méthionine sera arrêtée presque de façon instantanée car le renouvellement de la méthionine endocellulaire in vivo est rapide (chapitre IV). Si le soufre de la méthionine biosynthétisée par la cellule est marqué lors d'une culture en un milieu dont le $\text{SO}_4^{=}$ est radioactif on pourra suivre la méthionine de façon spécifique. Nous avons préféré marquer la méthionine endocellulaire par le soufre qu'elle contient : il aurait évidemment été possible de la marquer dans le carbone par culture à partir d'homosérine ou d'aspartate ^{14}C . Les résultats ne devant pas être différents suivant le marquage adopté puisque le soufre et le squelette carboné participent de façon stoechiométrique à la construction de la méthionine nous avons retenu le marquage au ^{35}S , plus spécifique de la méthionine. La souche sauvage 4094-B est commencée dans le milieu synthétique au sulfate marqué et cultivé jusqu'à une concentration cellulaire équivalant à 100 mg de cellules sèches par litre de culture. (les cultures sont et restent en phase de croissance exponentielle durant l'expérience). Une quantité déterminée de DL-méthionine est alors ajoutée à la culture afin d'atteindre la concentration de 0,8 mM qui ne perturbe pas la croissance cellulaire mais détermine une élévation notable de la concentration endocellulaire de méthionine (voir chapitre IV) et une répression efficace du taux de synthèse des enzymes du groupe I chez la souche utilisée (Cherest et coll., 1971). La croissance continue donc et des prélèvements de parties aliquotes de la culture permettent d'obtenir les extraits acellulaires selon les méthodes décrites (chapitre I) et d'y suivre, en fonction du temps, l'évolution de la méthionine endocellulaire radioactive. Une culture témoin permet de contrôler cette évolution en l'absence de méthionine ; dans ce cas la concentration est constante durant la phase exponentielle ; dès que la croissance se ralentit, elle a nettement tendance à s'élever :

nous ne considérons que les résultats obtenus strictement en phase exponentielle. Si les mécanismes de régulation par inhibition de l'activité enzymatique d'un ou plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse sont secondaires, le mécanisme de régulation par répression fera évoluer la concentration endocellulaire de la façon suivante : à partir du moment où la méthionine aura été ajoutée au milieu de culture la concentration en méthionine, étant -on le suppose- fonction du nombre de molécules enzymatiques présentes, sera divisée par 2 quand une génération cellulaire aura divisé par 2 le nombre de molécules enzymatiques impliquées dans cette biosynthèse. On suppose ici que la répression du taux de synthèse intervient dès la présence du co-répresseur (méthionine ou du dérivé de celle-ci) et qu'elle est totale. On peut ainsi calculer une "valeur théorique" de la concentration en méthionine biosynthétisée par la cellule, après addition de méthionine. Cette valeur s'exprime par :

$$\text{Valeur au temps } t_0 = \frac{\text{densité optique à } t_0}{\text{densité optique à } t}$$

La valeur adoptée au temps 0, est la moyenne des valeurs mesurées expérimentalement (1,24 moles par gramme de cellules sèches). Les valeurs obtenues par le calcul ci-dessus ont permis de tracer une courbe théorique (le temps moyen de division cellulaire est de 2h15 min).

On peut constater que, dans plusieurs expériences indépendantes, l'évolution de la biosynthèse endocellulaire de la méthionine est analogue à celle prévue par le calcul théorique (figure II.1 p.34). Le fonctionnement de la chaîne de biosynthèse n'est pas arrêté brutalement comme l'aurait entraîné une régulation par rétro-inhibition.

On conclut plutôt à une régulation par répression. Les dosages dans les extraits bruts acellulaires de l'homocystéine synthétase et de l'ATP sulfurylase, une génération cellulaire après addition de méthionine au milieu de culture, sont en accord avec cette interprétation. En effet, l'évolution des activités spécifiques de ces deux

enzymes est parallèle à l'évolution des concentrations endocellulaires de méthionine (tableau II-2 p. 35). Les deux types de résultats montrent que la répression est pratiquement totale dès la première génération. L'établissement de la courbe théorique suppose implicitement que le "turn-over" des protéines est nul durant la phase exponentielle : la corrélation obtenue entre résultats expérimentaux et résultats calculés conduit à admettre que le "turn-over" est faible dans ces conditions pour les enzymes de la voie de la méthionine.

II. 2 - REGULATION DU DERNIER ENZYME DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE : LA METHIONINE SYNTHETASE

Cet enzyme réalise sur l'homocystéine la fixation du radical méthyle transporté par les composés tétrahydrofoliques. Les études de Botsford et Parks (1967) avaient éliminé l'hypothèse d'une régulation par répression du taux de synthèse de cet enzyme. Les auteurs avaient mesuré des activités spécifiques faibles, de l'ordre de 0,5 n.mole de substrat transformé par milligramme de protéine et par minute. Nous avons voulu vérifier d'une part, s'il en était de même pour nos souches, et, d'autre part, si certains des mutants auxotrophes pour la méthionine, incapables de croître en présence d'homocystéine, étaient déficients en cet enzyme.

FIGURE II - I

Evolution, après addition au milieu de culture de 0,8 mM de DL méthionine, de la teneur endocellulaire en méthionine marquée dans le ^{35}S chez la souche 4094-B cultivée en milieu synthétique minimum.

LEGENDE

En abscisses : temps en heures. Le temps 0 coïncide avec l'addition de la méthionine au milieu de culture.

En ordonnées logarithmiques : teneur en méthionine radioactive exprimée en μ moles par gramme de cellules sèches.

La droite tracée, est celle obtenue par le calcul théorique basé sur une teneur initiale de 1,24 μ moles de méthionine par gramme de cellules sèches et sur un temps de division cellulaire de 2h15 min.

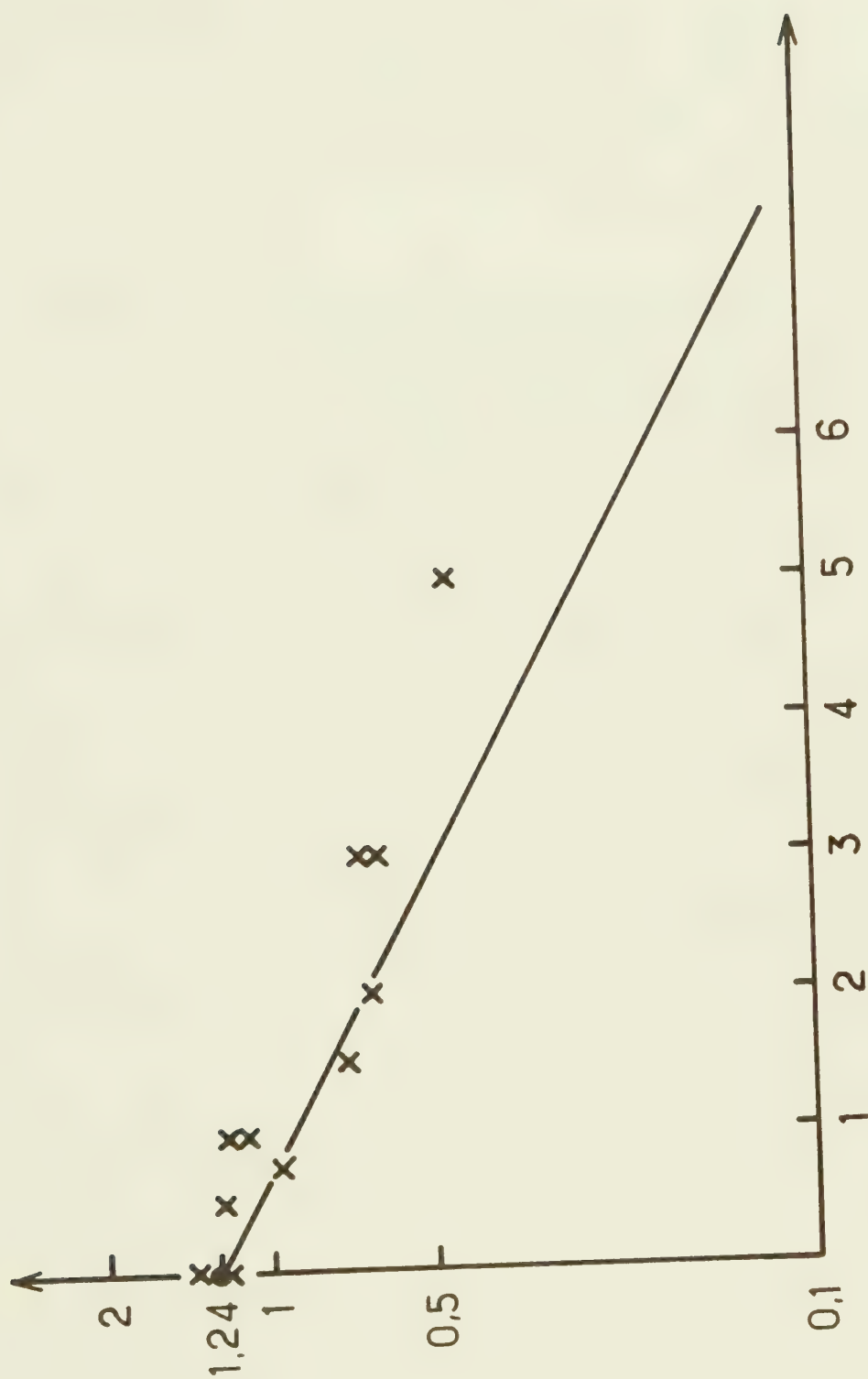


Figure II 1

TABLEAU II-2 - Evolution de l'activité spécifique de l'homocystéine synthétase et de l'ATP sulfurylase dosée dans les extraits bruts provenant de culture en présence de méthionine

Souche 4094-B cultivée en milieu synthétique minimum

Temps écoulé après addition de méthionine (0,8 mM)	Activités spécifiques : % observés par rapport aux activités au temps initial	
	Homocystéine synthétase	ATP sulfurylase
Temps initial	100	100
Temps 2 heures soit 1 génération cellulaire	65	50

Les résultats obtenus avec la souche sauvage de référence 4094-B (voir tableau II-3 p. 37) permettent de confirmer l'absence de régulation par répression du taux de synthèse de cet enzyme. Les activités spécifiques que nous avons mesurées, in vitro, sont du même ordre de grandeur que celles mesurées par les auteurs cités ci-dessus. Selhub (communication personnelle) a également constaté des activités spécifiques analogues à l'aide d'un dosage différent utilisant la radioactivité. Ces faibles valeurs reflètent cependant bien ce qui se passe in vivo et qui peut être évalué de la façon suivante. La teneur en méthionine des protéines de Sacch.cerevisiae est de l'ordre de 27μ moles par gramme de cellules sèches (voir chapitre IV). La teneur en méthionine endocellulaire libre chez ce microorganisme est de l'ordre de 1 à 2μ moles par gramme de cellules sèches chez une souche sauvage. Elle peut atteindre 15μ moles par gramme de cellules sèches chez une souche résistante à l'éthionine (voir chapitre IV). La teneur en méthionine activée en S-adenosyl méthionine est de 1 à 2μ moles par gramme de cellules sèches (voir chapitre V). La teneur en méthionine globale atteint donc 30μ moles par gramme de cellules sèches chez une souche sauvage et 45μ moles par gramme de cellules sèches chez une souche résistant à l'éthionine. Durant une génération cellulaire, qui dure environ 2 heures, il est par conséquent synthétisé 30 à 45μ moles de méthionine. Comme il y a environ 500 mg de protéines par gramme de cellules sèches chez la levure le calcul conduit à :

$$\frac{30 \times 1000}{120' \times 500 \text{ mg}} = 0,5 \text{ n.mole de méth. fabriquée/mg protéine/minute}$$

dans le cas de la souche sauvage, et à :

$$\frac{45 \times 1000}{120' \times 500} = 0,75 \text{ n.mole de méth. fabriquée/mg protéine/minute}$$

dans le cas de souches résistant à l'éthionine.

TABLEAU II-3 - Méthionine synthétase : Activité spécifique de cet enzyme après culture en milieu minimum ou après culture en milieu minimum supplémenté à 2mM de DL-méthionine

Souche 4094-B

Addition au milieu de culture	0	2mM DL-méthionine	% de répression
Activité spécifique de la méthionine synthétase en nmoles de substrat transformé par minute et par milligramme de protéine	0,89	0,93	0
	1,1	0,96	13
	0,98	-	-
	0,91	-	-

TABLEAU II-4 - Méthionine synthétase: Activité spécifique de cet enzyme dosé dans les extraits bruts provenant de culture en milieu minimum

Souches 199M₁ (éthionine sensible-méthionine prototrophe)
D38 (méthionine auxotrophe-pousse sur homocystéine)
D73 (auxotrophes pour la méthionine
B₂ incapables de croître sur homocystéine)

Souches	199M ₁	D38	D73	B ₂
Activité spécifique en nmoles par mg de protéine et par minute	1,2	1	0	0

On constate une excellente corrélation entre ces chiffres estimés à partir de données physiologiques et ceux mesurés au cours des dosages in vitro où l'enzyme est placé dans des conditions optimales de fonctionnement. Le dosage de l'activité spécifique de cet enzyme chez d'autres souches sauvages sensibles à l'éthionine ou chez des mutants auxotrophes bloqués dans la voie de la méthionine en des étapes différentes de celle catalysée par la méthionine synthétase, a permis de vérifier son bas niveau d'activité spécifique. Le dosage des activités spécifiques de la méthionine synthétase chez des souches résistant à l'éthionine sera évoqué en détail dans le chapitre V : il conduit également à des chiffres du même ordre (tableau V-4 p.100) . Enfin, les extraits bruts de deux souches auxotrophes exigeant, pour leur croissance, la méthionine à l'exclusion de tout autre métabolite, ont été dosés par cette méthode. Les résultats montrent bien l'absence totale de synthèse de méthionine in vitro dans les conditions décrites (tableau II-4 p. 37) : la méthionine synthétase peut donc être absente des extraits bruts de ces deux souches. Toutefois, cette absence de synthèse in vitro peut également être due à une déficience dans le système de régénération des composés tétrahydrofoliques, régénération qui est indispensable au fonctionnement du système in vitro (voir Matériel et Méthodes). L'équivoque est levée pour la souche "B₂" dont la méthionine synthétase a été dosée par une méthode plus spécifique (Selhub, communication personnelle) qui a démontré l'absence d'activité enzymatique détectable et pour la souche D 73 qui porte une mutation allèle de celle portée par la souche "B₂" : en effet le diploïde obtenu entre ces deux souches exige la méthionine pour sa croissance.

II. 3 - CONCLUSION

La régulation de la voie de biosynthèse de la méthionine chez Sacch.cerevisiae ne comporte pas de phénomène décelable de rétro-inhibition par la méthionine : tout indique que le mécanisme de répression

du taux de synthèse de certains des enzymes participant à cette voie de biosynthèse est le mécanisme essentiel par lequel la régulation s'opère.

La méthionine synthétase, dernier enzyme de la chaîne, n'appartient pas au groupe des enzymes soumis à la répression de synthèse.

CHAPITRE III

ETUDE DE DIVERS MUTANTS RESISTANT A L'ETHIONINE

Le nombre élevé de souches sélectionnées de façons différentes pour leur résistance à l'éthionine, nous a incité à déterminer si les mutations qu'elles portaient, étaient situées au même locus ou en des loci différents et si les répercussions de ces mutations au niveau du contenu enzymatique de ces souches étaient du même ordre.

Nous décrirons les effets des mutations "eth 3-1", ceux des mutations portées par les souches 4094 B.S 4 et 4094 B.E 10 et enfin ceux des mutations au locus E T H 2 (eth 2.2 ; eth 2.3 ; eth 2.4 ; eth 2.5). Les effets de ces mutations seront toujours comparés à ceux entraînés par la mutation "eth 2.1" précédemment étudiée par H. Cherest et coll. (1971). Le comportement de la souche sauvage 4094-B cultivée dans les mêmes conditions servira de référence.

III. 1 - ETUDE DE QUELQUES MODIFICATIONS ENTRAINEES PAR LES MUTATIONS "eth 3.1" ; "sem 4.1" ; "eth 10.1"

III - 1.1. - Origine des souches

"eth 3.1" : 4094 B.6. est une souche résistant à l'éthionine isolée à partir de la souche sauvage 4094-B par sélection par transferts successifs en milieu synthétique additionné d'éthionine. Le génome de cette souche s'est avéré porter deux mutations en deux loci indépendants : l'une d'elle a été désignée par la référence "eth 3.1".

"sem 4.1" : est une mutation monogénique portée par la souche 4094 B.S 4 ; cette mutation confère à la souche qui la porte la résistance à la sélénométhionine, - analogue de la méthionine qui a permis la sélection de cette souche -, et également à l'éthionine.

"eth 10.1" : est une mutation portée par la souche 4094 B.E 10 ; cette souche résistant à l'éthio-

TABLEAU III-1 : niveau de résistance des souches
étudiées : le niveau est exprimé
par la dose létale 50 (D L.50)

Souche	Génotype de résistance	"D L. 50" *
4094 B	type sauvage	<0,1 mM
C C 17.6 A	eth 2.1	0,35 mM
C H 71.5 A	eth 3.1	0,75 mM
4094 B.S 4	sem 4.1	6 mM
4094 B.E 10	eth 10.1	1 mM

* La DL 50 est la dose d'éthionine qui réduit le
taux de croissance de 50% de sa valeur mesurée en
milieu dépourvu d'éthionine .

nine a été sélectionnée par transferts successifs de la souche sauvage 4094-B sur des milieux synthétiques contenant de l'éthionine.

III - 1.2 - Physiologie de la résistance à l'éthionine

La résistance est testée en milieu liquide synthétique (G 21) additionné de quantités croissantes de D L-éthionine. Elle est exprimée suivant un critère analogue à la "dose létale 50" : la concentration d'éthionine qui cause une réduction de 50% du taux de croissance sert à caractériser le niveau de résistance de la souche. Le tableau III.1 p. 42 donne ces niveaux pour les trois souches considérées ainsi que pour la souche sauvage de référence 4094-B et pour la souche qui porte la mutation "eth 2.1". Toutes ces souches sont normales en ce qui concerne les mécanismes de perméation à l'éthionine et à la méthionine, testés suivant les techniques décrites dans matériel et méthodes.

III - 1.3 - Caractérisation génétique des trois mutations étudiées

1.3.1. Ségrégation mendélienne - relation de dominance

Les souches portant les mutations de résistance "eth 3.1", "sem 4.1", "eth 10.1" ont été croisées avec des souches sensibles à l'éthionine, de signe sexuel compatible. L'étude des croisements effectués a montré que chacune de ces mutations était monogénique puisque les ségrégations observées dans un nombre suffisant de tétrades isolées (20 à 30) étaient toujours du type 2 spores résistantes/2 spores sensibles. Les diploïdes obtenus dans chaque cas se sont révélés être légèrement résistants sans toutefois parvenir au niveau de résistance des souches haploïdes

résistantes impliquées dans le croisement : il n'y a pas dominance ni même semi-dominance mais la récessivité n'est pas absolue.

1.3.2. Relations avec le locus ETH 2, ségrégation

L'étude des croisements entre, d'une part les souches CH 71-5A (α , eth 3.1) ; 4094 B.S 4 (α , sem 4.1) 4094 B.E 10 (α , eth 10.1) et d'autre part la souche C C 17.6 A (α , eth 2.1) exclut une liaison entre les loci E T H 3, S E M 4, E T H 10, et le locus E T H 2.

Les ségrégations observées dans au moins 20 tétrades - vérifiées authentiques par l'étude de la ségrégation des marqueurs d'auxotrophies - étaient du type : 1 tétrade parentale / 1 tétrade recombinée / 4 tétrades tétra-types pour la résistance à l'éthionine.

Récessivité incomplète : la combinaison diploïde obtenue dans le croisement de la souche CH 71.5A (eth 3.1 ; E T H 2) par la souche C C 17.6 A (E T H 3 ; eth 2.1) s'écrit :

$$\frac{\text{eth 3.1}}{\text{E T H 3}} \quad ; \quad \frac{\text{E T H 2}}{\text{eth 2.1}}$$

La présence d'une seule dose de l'allèle "eth 2.1" dans les deux génomes d'un diploïde par ailleurs sauvage, n'entraîne pas de résistance à l'éthionine puisque la mutation "eth 2.1" est récessive. La présence d'une seule dose de l'allèle "eth 3.1" entraîne une légère résistance à l'éthionine (0,2 mM). Par contre la présence d'une dose de l'allèle "eth 3.1" et d'une dose de l'allèle "eth 2.1" (diploïde ci-dessus) entraîne une résistance équivalant à celle des souches haploïdes portant soit "eth 3.1" soit "eth 2.1".

Cette situation particulière a été retrouvée dans d'autres croisements : elle mériterait d'être approfondie notamment par l'étude de la régulation chez de tels diploï-

des. Chez J.M. Wiame et coll. (1970) l'étude biochimique des diploïdes, portant deux des trois mutations de régulation "arg R I", "arg R II", "arg R III", a montré qu'ils avaient une régulation normale : les auteurs n'ont pas étudié la résistance à la canavanine. Si, comme on peut s'y attendre, ces diploïdes sont sensibles à la canavanine et que les nôtres sont perturbés dans leur régulation la situation serait différente dans les deux systèmes.

1.3.3. Relations génétiques avec "M E T 2" gène de structure de l'homosérine - O - transacétylase

Ségrégation : l'étude du croisement de la souche CH 71-5 A et d'une souche portant la déficience "met 2" du gène codant l'homosérine transacétylase a montré que sur les 70 spores prototrophes pour la méthionine - issues de 35 tétrades "vraies" - il y avait 35 spores résistantes : ceci en faveur d'une absence de liaison entre les loci E T H 3 et M E T 2.

Utilisation de l'éthionine comme source de méthionine : le phénomène de l'utilisation de l'éthionine par les auxotrophes pour la méthionine portant la mutation "eth 2.1" - mis en évidence par H. Cherest (1970) - se retrouve également avec la combinaison (met 2 ; "eth 3.1"). Il semble que la règle générale suivante puisse être avancée : les croisements dans lesquels interviennent des possibilités de recombinaison génétique entre le gène de structure de l'homosérine transacétylase et un gène de résistance à l'éthionine, entraînent l'apparition de souches auxotrophes pour la méthionine qui utilisent l'éthionine comme substitut de la méthionine.

1.3.4. Relations génétiques entre les loci
E T H 3, S E M 4 et E T H 10

Les croisements, deux à deux, des souches portant les mutations de résistance à l'un ou l'autre des loci, ont donné lieu à des ségrégations où la résistance à l'éthionine s'exprimait comme étant causée par la combinaison de deux gènes non liés.

1.3.5. Relations génétiques avec le locus
portant le gène de structure de la méthionyl-t-
RNA synthétase.

Il y a absence de liaison également entre les trois loci portant les gènes de résistance et celui portant la mutation "ts 296" que Hartwell (1969) a caractérisée comme une mutation dans le gène de structure de la méthionyl-t-RNA synthétase. Cette mutation "ts 296" isolée pour la thermosensibilité de la souche qui la porte confère également à cette souche une résistance à l'éthionine : ceci s'expliquerait par la difficulté pour cette souche d'incorporer l'éthionine dans les protéines, incorporation qui représente une des causes de la toxicité de l'éthionine. L'absence de liaison entre les loci portant les trois gènes de résistance et le locus codant la méthionyl-t-RNA synthétase excluerait une modification de cet enzyme chez ces souches résistantes si cet enzyme était un monomère ou un homopolymère. Par contre s'il s'agissait d'un hétéropolymère, il ne serait pas exclu que l'une des mutations (ou plus d'une ?) puisse être une modification d'un gène codant une chaîne protéique de la méthionyl-t-RNA synthétase différente de celle codée par le locus portant la mutation "ts 296". Le dosage de cet enzyme dans des extraits bruts (dialysés pour éliminer la méthionine présente dans les extraits bruts) a montré que les K_m pour la méthionine, pour l'A T P et pour le t-RNA^{met} n'étaient pas signifi-

cativement différents (d'après Y.S. Kerjan et H. Cherest). Il paraît donc peu probable que l'une de ces trois mutations conférant la résistance puisse correspondre à la modification d'un locus codant un éventuel monomère de la méthionyl-t-RNA synthétase différent de celui codé par le locus portant la mutation "ts 296".

III - 1.4 - Régulation de quelques enzymes de la voie de la méthionine .

1.4.1. Homocystéine synthétase

Il a été montré que la synthèse de cet enzyme chez la souche sauvage cultivée en milieu synthétique minimum additionné de 2 mM de DL-méthionine, atteignait seulement 20% de la synthèse de cet enzyme mesurée après culture en milieu minimum : la répression du taux de synthèse de l'enzyme de la souche sauvage dans ces conditions est de 80%. La répression du taux de synthèse, définie et mesurée de la même façon, de l'enzyme présent chez la souche portant la mutation "eth 2.1" est seulement de 50% (Cherest et coll. 1971). La mesure, dans les mêmes conditions, de la répression du taux de synthèse de l'enzyme présent chez les souches portant les mutations "eth 3.1" ou "sem 4.1" a donné un chiffre situé entre 20 et 30% alors qu'un chiffre inférieur à 10% est atteint avec la souche portant la mutation "eth 10.1" (tableau III-2 p. 48).

1.4.2. A T P sulfurylase

Les mêmes critères utilisés pour étudier l'homocystéine synthétase ont été appliqués à l'étude de l'A T P sulfurylase (tableau III-3 p. 49).

TABLEAU III-2 Repressibilité de la synthèse de l'homocystéine synthétase chez différentes souches

Remarque : Nous avons indiqué dans ce tableau :

1. l'activité spécifique de l'enzyme dosé après culture en milieu synthétique minimum soit A S o
2. l'activité spécifique de l'enzyme dosé après culture en milieu synthétique minimum additionné de 2 mM de DL méthionine soit A S meth.
3. la répression R du taux de synthèse de l'enzyme calculée comme suit :

$$\frac{(A \text{ So} - A \text{ S meth}) \times 100}{A \text{ S o}} \quad \text{pour la souche considérée.}$$

Souches	4094 B	C C 17.6 A (eth 2-1)	CH 71.5 A (eth 3-1)	4094 B.S 4 (sem 4-1)	4094 B.E 10 (eth 10-1)
A S o	340	347	344	383	350
A S meth	80	201	271	325	342
R	77	42	21	15	2

TABLEAU III-3

Répressibilité de la synthèse de l'A T P sulfurylase
chez différentes souches

(mêmes remarques qu'au tableau III-2)

Souches	4094 B	CC 17.6A (eth 2-1)	CH 71.5A (eth 3-1)	4094 B.S4 (sem 4-1)	4094B.E10 (eth 10-1)
(1) ASo	148	177	107	147	153
(2) AS meth	15	22	33	115	143
(3) R	90	87	69	22	6

TABLEAU III-4

Répressibilité de la synthèse de la sulfite réductase
chez différentes souches

(mêmes remarques qu'au tableau III-2)

Souches	4094 B	CH 71.5A (eth 3.1)	4094 B.S4 (sem 4.1)	4094 B.E 10 (eth 10.1)
(1) ASo	1,7	1,67	1,75	1,5
(2) ASmeth	0,07	0,65	0,98	0,87
(3) R	95	61	44	42

1.4.3. Sulfite réductase

Le tableau III-4 p. 49 donne les résultats obtenus lors de l'étude de cet enzyme. Il s'avère, après examen des tableaux III-2, III-3, III-4 que la répression du taux de synthèse des enzymes est totale chez la souche sauvage mais qu'elle est moindre chez les souches résistantes. Elle est d'autant réduite que la souche étudiée montre un niveau élevé de résistance à l'éthionine : la souche 4094 B.E. 10 continue à synthétiser une quantité importante de ces trois enzymes quand elle est cultivée en présence de méthionine 2 mM dans le milieu de culture.

III - 1.5 - Synthèse déréprimée de l'homocystéine synthétase et de l'A T P sulfurylase dans des conditions de limitation en méthionine

L'utilisation de mutants auxotrophes pour la méthionine permet de comparer les taux de synthèse de ces deux enzymes en présence d'une gamme plus étendue de méthionine exogène. En effet, ces mutants ont besoin de méthionine pour assurer leur croissance et une concentration de 0,2 mM en DL-méthionine permet d'obtenir une croissance analogue à celle de la souche sauvage prototrophe et des niveaux enzymatiques comparables. Une concentration de 2mM en DL-méthionine permet de réprimer la synthèse de ces enzymes si les souches auxotrophes ne portent pas par ailleurs de gène de résistance dans leur génome. Enfin, l'utilisation de chemostats, limités en méthionine, permet d'étudier la synthèse des enzymes quand la croissance est limitée par la méthionine. On constate dans ces dernières conditions, qu'il est possible d'augmenter l'activité spécifique des enzymes dosés dans l'extrait brut acellulaire par rapport au niveau observé après culture additionnée de 0,2 mM de méthionine : ceci est en faveur d'une synthèse déréprimée des enzymes sous l'effet de la limi-

tation en méthionine. Le tableau III-5 p. 52 donne l'évolution des activités spécifiques de l'homocystéine synthétase et de l'A T P sulfurylase dosées dans les extraits bruts de la souche D 6 au cours de chemostats limités par la méthionine : les fractions sont les volumes, recueillis dans la glace, qui correspondent chacun à un renouvellement du vase de culture. La culture en milieu synthétique additionné de 0,2 mM de DL-méthionine a servi d'une part à doser l'activité spécifique du temps 0 du chemostat et d'autre part à ensemen- cer le chemostat. Nous sommes ici obligés d'anticiper sur les résultats qui seront exposés dans le chapitre IV pour établir la corrélation entre les divers niveaux enzymatiques observés et la concentration endocellulaire de méthionine : cette concentration endocellulaire, qui dépend directement des conditions de culture, a été mesurée dans les diverses cultures et figure également dans le tableau III-5.

La même étude réalisée avec la souche CC.146.6A, une souche résistante portant la mutation "eth 2.1", donne des résultats analogues et permet de conclure que si la mutation "eth 2.1" affecte la répressibilité des enzymes, elle ne semble pas jouer un rôle déterminant dans la synthèse déréprimée des deux enzymes étudiés après culture en conditions limitantes de méthionine (tableau III-6 p. 53). La possibilité de déréprimer la synthèse de ces enzymes indique également que dans les conditions où la méthionine est présente à une concentration non réprimante (0,2 mM en DL-méthionine) ni limitante, la synthèse n'est pas déréprimée malgré la présence de la mutation affectant la répressibilité. Le tableau III-7 p. 54 illustre le comportement de la souche CJ 21-6A, (souche auxotrophe pour la méthionine et portant la mutation de résistance "eth 3.1") en chemostat limité par la méthionine. Les remarques faites pour la souche auxotrophe portant la mutation "eth 2.1" sont valables pour celle portant la mutation "eth 3.1".

TABLEAU III-5

L'homocystéine synthétase et l'A T P sulfurylase
chez la souche D 6

(α - ura - met 2 - eth s) :

Evolution des activités spécifiques en fonction des conditions de croissance et plus précisément de la concentration endocellulaire de méthionine.

Conditions de croissance	Homocystéine synthétase : activité spécifique (1)	A T P sulfurylase : activité spécifique (1)	Concentration endocellulaire de la méthionine (2)
Culture en milieu synthétique + 2mM D L méthionine	40	15	6
Culture en milieu synthétique + 0,2mM D L méthionine	172	122	0,8
<u>Culture en chémostat limité, par la méthionine</u>			
. Fraction 0 (idem ci-dessus en 0,2mM méthionine)	172	122	0,3
. Fraction I	228	164	< 0,3
. Fraction II	370	280	< 0,3
. Fraction III	535	272	< 0,3

(1) les activités spécifiques sont exprimées en n.moles de substrat transformé par minute et par mg de protéine.

(2) la concentration endocellulaire de méthionine est exprimée en μ moles par gramme de cellules sèches.

TABLEAU III-6

Homocystéine synthétase et A T P sulfurylase chez la

souche CC.146-6A

(met 2, eth 2-1)

Evolution des activités spécifiques en fonction des
conditions de croissance

Conditions de croissance	Homocystéine synthé- tase (activité spé- cifique) (1)	A T P sulfurylase (activité spéci- fique) (1)
<u>Culture en milieu syn- thétique + 2 mM D L méthionine</u>	71	31
<u>Culture en milieu syn- thétique + 0,2 mM D L méthionine</u>	290	71
<u>Culture en chemostat limité par la méthio- nine</u>		
Fraction 0 idem ci-dessus en 0,2 mM méthionine	290	71
Fraction I	320	59
Fraction II	485	125
Fraction III	570	150

(1) Voir Tableau III-5

TABLEAU III-7

Homocystéine synthétase et A T P sulfurylase chez

la souche CJ 21-6A

(met 2, eth 3-1)

Evolution des activités spécifiques en fonction des conditions de croissance

Conditions de croissance	Homocystéine synthétase activité spécifique (1)	A T P sulfurylase activité spécifique (1)
Culture en milieu synthétique + 2 mM méthionine	120	35
Culture en milieu synthétique + 0,2 mM méthionine	150	119
<u>Culture en chemostat limité par la méthionine</u>		
Fraction 0 (idem ci-dessus en 0,2 mM méthionine)	150	119
Fraction I	345	206
Fraction II	435	155
Fraction III	710	197
Fraction IV	650	200

(1) Voir Tableau III-5

III - 1.6 - Etude des t-RNA méthionine globaux

L'étude de la souche "ts 296" (Cherest et coll. 1971) avait montré une corrélation entre le taux de charge des t-RNA^{met} et la répressibilité de la synthèse des trois enzymes étudiés. On pouvait imaginer une corrélation similaire chez les mutants isolés pour leur résistance et perturbés dans leur régulation. L'étude de l'état de charge des t-RNA globaux chez 4094-B et chez CH 71-5A ("eth 3.1") a permis d'exclure une modification du taux de charge des t-RNA^{met} de cette dernière souche (tableau III-8 p. 56). Seule l'hypothèse de la modification d'une espèce mineure de t-RNA^{met} pourrait se concevoir ici comme elle a été proposée lors de l'étude de la mutation "eth 2.1". Jusqu'à présent, il n'a pas été décelé de différence notable entre les mutants de régulation et le type sauvage dans les différents pics t-RNA^{met} que l'on obtient après séparation sur colonne de méthyl albumine kieselguhr (A. Fradin communication personnelle).

III - 1.7 - Conclusions relatives à l'étude des trois gènes de résistance "sem 4.1", "eth 3.1", "eth 10.1"

Nous sommes donc en présence de trois gènes qui ne sont liés ni entre eux, ni à E T H 2 ni au gène de structure de la méthionyl-t-RNA synthétase. La méthionyl-t-RNA synthétase des souches portant ces mutations n'apparaît pas modifiée. La principale caractéristique des souches portant ces allèles de résistance est la diminution de la répressibilité (telle qu'elle a été définie en III-1.4.1) des enzymes de la voie de biosynthèse de la méthionine - en particulier la répressibilité de l'homocystéine synthétase et de l'A T P sulfurylase. Les enzymes étudiés n'apparaissent pas avoir un taux de synthèse déprimé : en effet,

TABLEAU III-8

Taux de charge t-RNA^{met} globaux après culture en milieu synthétique réprimant (2 mM de DL méthionine) ou non réprimant (pas d'addition de méthionine)

Souche 4094-B = éthionine sensible

Souche CH 71-5A = éthionine résistant "eth 3-1"

Conditions de culture Souches	Milieu synthétique minimum	Milieu synthétique minimum + 2 mM DL méthionine
4094-B	95 %	92 %
CH 71-5A	100 %	100 %

en milieu synthétique minimum, les activités spécifiques des enzymes étudiés chez les souches résistantes et chez les souches sensibles sont du même ordre ; et il est toujours possible en limitation de méthionine de déréprimer le taux de synthèse de ces enzymes d'une façon analogue à celle obtenue chez une souche éthionine sensible.

III - 2 - RESULTATS DE L'ETUDE DES MUTANTS AU LOCUS E T H 2 .

Les mutations isolées au locus E T H 2 ont donné trois sortes de comportements étudiés par M. Masselot et coll. (1972).

Les souches portant la mutation "eth 2.3" se comportent comme celles portant la mutation "eth 2.1" déjà décrites : l'homocystéine synthétase et l'A T P sulfurylase ont un taux de synthèse réprimé respectivement à 36 ou 55% - au lieu de 90% chez le type sauvage - quand on cultive ces souches en milieu synthétique additionné de méthionine 2 mM.

La mutation "eth 2.2", qui est une mutation non sens, confère à la souche qui la porte une absence presque absolue de répressibilité de la synthèse des enzymes par la méthionine.

Enfin les mutations "eth 2.4", "eth 2.5", "eth 2.7" bien que conduisant à une résistance à l'éthionine, entraînent une répressibilité - comparable à celle observée chez les souches sauvages - du taux de synthèse des deux enzymes par la méthionine.

Ces résultats sont regroupés dans le tableau III-9 p. 58.

TABLEAU III-9

Caractéristiques des souches portant des mutations
de résistance au locus E T H 2

No. allèle	Répressibilité de synthèse des enzymes (1)		Résistance à l'éthionine "D L.50"
	Homocystéine synthétase	A T P sulfurylase	en mM de D L éthionine
eth 2-2	3	9	20
eth 2-3	36	55	3,5
eth 2-4	79,4	85,6	0,3
eth 2-5	85	93	0,2
eth 2-7	75,2	-	0,125

(d'après M. Masselot)

(1) Le taux de répression indiqué est calculé suivant les mêmes
critères que ceux décrits dans le Tableau III-2

CHAPITRE IV

CONCENTRATIONS ENDOCELLULAIRES EN METHIONINE LIBRE
CHEZ DIFFERENTES SOUCHES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

L'hypothèse émise par H. Cherest dans sa thèse (1970) nous a conduit à étudier la présence de méthionine libre au sein de la cellule aussi bien chez une souche sauvage sensible à l'éthionine que chez des souches résistant à l'éthionine. Cet auteur avait supposé la présence de quantités anormalement élevées de méthionine chez les souches portant la mutation de résistance à l'éthionine "eth 2.1". Nous avons appliqué cette hypothèse à tous les mutants résistants. Nous avons également étudié l'influence des conditions de culture sur la présence de cette méthionine endocellulaire libre.

IV - 1 - ETUDE DE LA SOUCHE SAUVAGE DE REFERENCE 4094-B SENSIBLE A L'ETHIONINE. METHODE MICROBIOLOGIQUE

IV - 1.1 - Etude en milieu synthétique minimum

Les mesures ont été réalisées à partir de cellules obtenues de trois façons différentes.

1/ La mesure est faite à partir de cellules provenant de cultures arrêtées au cours de la phase de croissance exponentielle à une densité cellulaire correspondant à 360 mg de poids sec par litre. Nous avons choisi ces conditions parce que les extraits bruts acellulaires utilisés pour les dosages des enzymes de la voie de biosynthèse de la méthionine sont obtenus à partir de cellules récoltées dans le même état physiologique (Cherest et coll., 1971). Le tableau IV-1 p. 61 illustre la reproductibilité de la mesure dans plusieurs expériences indépendantes.

2/ Les mesures de méthionine endocellulaire libre sont effectuées à partir de cellules issues de cultures en phase de croissance exponentielle mais la densité cellulaire varie de 250 mg de cellules sèches par litre à 430 mg de cellules sèches par litre. La teneur endocellulaire en méthionine libre ne varie pas au cours de la phase de croissance exponentielle (tableau IV-2 p. 61). Nous avons vu, dans le chapitre II que cette teneur constante durant la

TABLEAU IV-1

Concentration endocellulaire de méthionine libre
chez 4094-B : la mesure est effectuée à une den-
sité cellulaire correspondant à 360 mg cellules
sèches/litre après culture en milieu synthétique
minimum YNB

Expériences indépendantes	1ère	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème
Concentration endocellulaire en méthionine libre exprimée en μ moles/g poids sec	1,5	1,8	1,5	1,4	1,5	1,6

TABLEAU IV-2

Variations de la teneur endocellulaire de méthionine
libre chez 4094-B au cours de la phase exponentielle
de croissance en milieu synthétique minimum

Concentration cellulaire du milieu de culture en mg poids sec/litre	250	280	310	430
Concentration endocellulaire en méthionine libre en μ moles/g poids sec	1,4	1,3	1,4	1,5

phase de croissance exponentielle est vérifiée par les mesures de méthionine endocellulaire avec la méthode radioactive.

3/ Des mesures faites dans des conditions assez différentes (cellules issues de boîtes de milieu nutritif gélosé incubées 48 heures) conduisent à une concentration de 2μ moles par gramme de cellules sèches.

Le calcul de la concentration de méthionine libre dans le cytoplasme aboutit à 0,4 mM en utilisant l'équivalence définie dans le chapitre I "Matériel et Méthodes" (1 gramme de poids sec $\rightarrow$ 4 cm³ de volume cellulaire).

IV - 1.2 - Etude en milieu synthétique additionné de méthionine

Deux types d'expérience ont été réalisés :

1/ Addition de méthionine à des cultures dont la densité cellulaire est élevée

Les milieux synthétiques de culture, inoculés à une densité cellulaire équivalant à 3 mg de cellules sèches par litre, sont incubés jusqu'à obtention d'une densité cellulaire correspondant à 200 mg de cellules sèches par litre. A ce stade, on ajoute au milieu une quantité déterminée de DL-méthionine permettant d'obtenir la concentration finale désirée (entre 0,1 mM et 2 mM) ; des mesures de concentration endocellulaire de méthionine libre sont effectuées par la suite. La croissance continue et la densité cellulaire atteint l'équivalent de 800 mg de cellules sèches par litre après 4 heures d'expérience. Une attention particulière est apportée au lavage des cellules et les surnageants des différents lavages sont testés de façon à contrôler la disparition de la méthionine extracellulaire avant de procéder à la fabrication de l'extrait bouilli. La figure IV-1 p. 63 montre les variations de la concentration endocellulaire de méthionine libre suivant le temps et la concentration exogène

F I G U R E IV-1 :

Variations de la teneur endocellulaire en L-méthionine libre
après addition de DL-méthionine à la culture au temps initial.

souche 4094-B milieu YNB

L E G E N D E

En abscisses : Temps en heures

En ordonnées : Teneur endocellulaire en L-méthionine
libre exprimée en μ moles par gramme
de cellules sèches.

Courbe 0 : pas d'addition de méthionine
Courbe I : addition de 0,1 mM de méthionine
Courbe II : addition de 0,2 mM de méthionine
Courbe III : addition de 0,8 mM de méthionine
Courbe IV : addition de 2 mM de méthionine

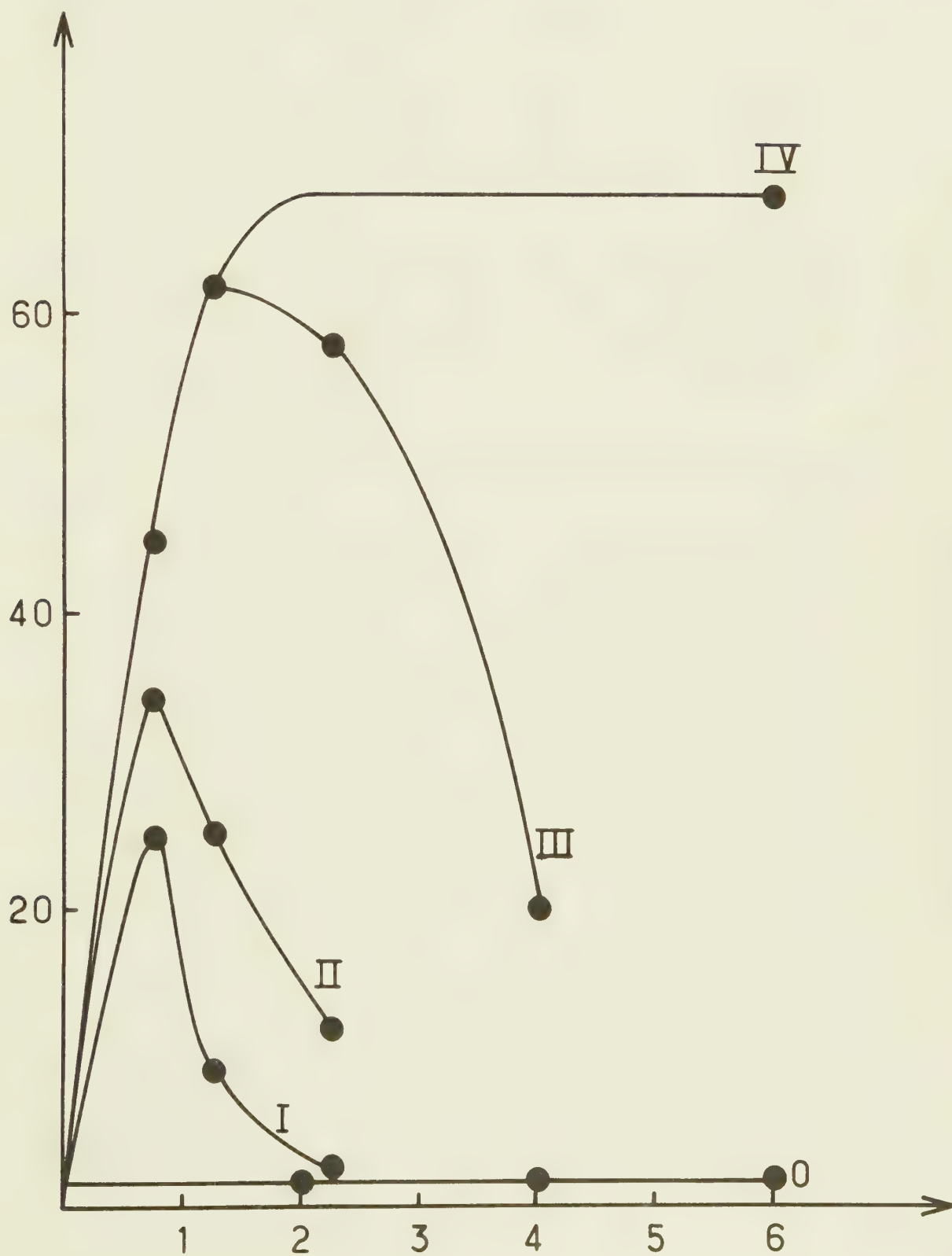


Figure IV 1

ajoutée, et illustre en partie, la cinétique d'entrée de la méthionine dans la cellule en fonction de ces deux facteurs. Nous enregistrons, plus exactement la résultante de plusieurs phénomènes :

- d'une part, l'entrée de la méthionine dans le réservoir cellulaire, entrée que l'on peut considérer comme seul phénomène actif durant les premières minutes (Grenson 1966).
- d'autre part, l'utilisation de la méthionine, une fois présente dans le cytoplasme, soit pour charger le t-RNA^{met} et intervenir dans la synthèse protéique, soit pour former la S.adénosyl-méthionine et servir aux méthylations cellulaires.

Ces deux derniers phénomènes viennent s'opposer au phénomène d'accumulation.

En fonction du temps écoulé et suivant la concentration initiale exogène de méthionine, le "réservoir cellulaire" peut être rempli et le rester (2 mM de méthionine exogène - courbe IV sur la figure IV-1 p. 63 ou, après remplissage complet ou partiel, se vider (0,8 mM ou doses inférieures de méthionine exogène - courbes I, II, III sur la figure IV-1 p. 63). Ces variations dépendent également de la densité cellulaire du milieu de culture au moment de l'addition de méthionine. Plus la densité cellulaire sera élevée, plus les phénomènes d'utilisation de la méthionine retentiront sur la mesure de l'équilibre global d'où l'obtention de courbes de types I, II, III (figure IV-1 p.63) ; à l'inverse, si la densité cellulaire initiale est plus faible, les courbes obtenues avec des concentrations peu élevées de méthionine (0,2 mM) auront un tracé du type IV. Quelles que soient les conditions, il s'avère que la quantité maximale de méthionine admissible dans la cellule est de l'ordre de 60 à 70 micromoles par gramme de cellules sèches. Le calcul de la molarité endocellulaire en fonction des paramètres définis dans "Matériel et Méthodes" aboutit à 15 mM de L-méthionine endocellulaire libre dans les conditions extrêmes.

2/ Addition de méthionine dès le début de la culture

Des milieux de culture synthétiques, préalablement additionnés de DL-méthionine à des concentrations variant entre 0,2 mM et 2 mM, sont inoculés de façon à avoir une densité cellulaire correspondant à 3 mg de cellules sèches par litre. Après 18 heures d'incubation, les différentes cultures sont arrêtées, la densité cellulaire correspond alors à 360 mg de cellules sèches par litre. Les cellules sont récoltées et soumises au traitement permettant le dosage de la méthionine endocellulaire. La figure IV-2 p. 66 illustre les valeurs de L-méthionine libre endocellulaire observées lors de telles expériences. Il convient de noter ici les relations qui existent entre ce type d'expérience et le type précédemment décrit : il s'agit, si l'on peut dire, d'un instantané photographique pris après 18 heures d'incubation à partir du temps initial où la méthionine a été ajoutée alors que la densité cellulaire était très faible. Cet instantané enregistre l'état auquel le réservoir cellulaire est parvenu. Comme dans le premier type d'expérience, les résultats des mesures effectuées sont toujours fonction de plusieurs facteurs : densité cellulaire des milieux lors de l'inoculation et lors de la récolte de la culture, concentration de méthionine exogène, croissance cellulaire impliquant la consommation de méthionine. A ces phénomènes (déjà présents dans le premier type expérimental) s'ajoute, ici, l'influence de l'état dans lequel se trouve le système biosynthétique propre à la cellule : comme l'ont montré Cherest et coll. (1971) il est réprimé totalement en présence de doses de méthionine exogène importantes (2 mM), et ne joue aucun rôle dans ces conditions. Par contre, s'il est partiellement réprimé (0,2 mM ; 0,5 mM), il vient apporter sa contribution à l'équilibre endocellulaire en synthétisant de la méthionine. Il apparaît plausible que l'allure exponentielle de la courbe illustrant les résultats (on obtient une droite en coordonnées semi-logarithmiques) soit le reflet de la croissance, elle-même exponentielle. Le phénomène est certainement plus compliqué mais il nous a paru inutile de l'approfondir pour l'instant. On peut penser que lors de l'inocu-

F I G U R E I V - 2 :

Concentration endocellulaire de L-méthionine libre après culture en présence de quantités croissantes de DL-méthionine.

Souche 4094-B milieu YNB

L E G E N D E

En abscisses : Concentration exocellulaire de DL méthionine exprimée en mM.

En ordonnées : Teneur endocellulaire en L-méthionine libre exprimée en μ moles par gramme de cellules sèches (ordonnées logarithmiques).

2 séries de résultats sont matérialisés par des $\bullet$ et $\times$

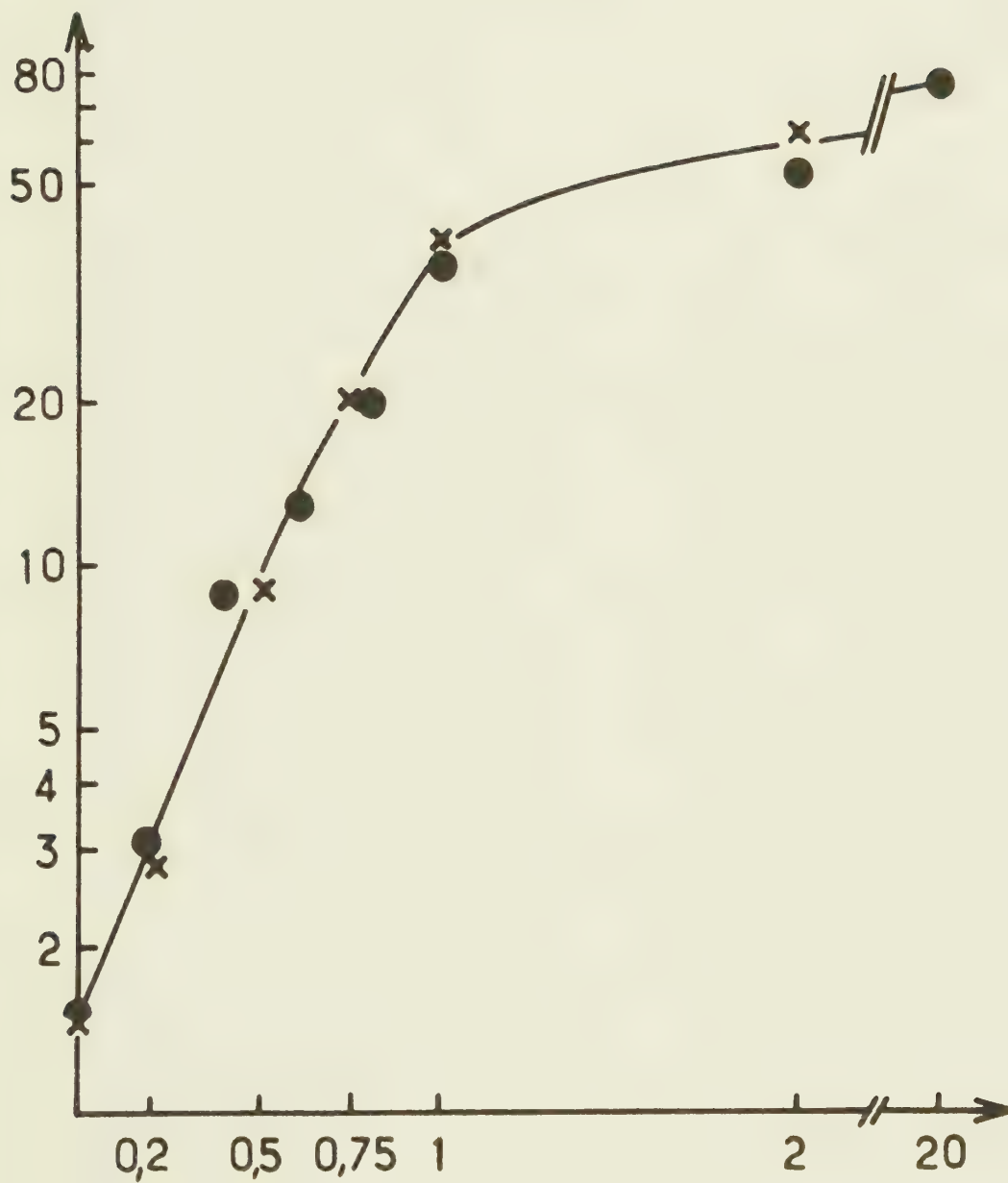


Figure IV 2

lation à faible densité cellulaire, dans un milieu synthétique additionné de méthionine, les cellules se sont remplies de méthionine: en effet le rapport de la quantité de méthionine dans le milieu à la quantité de cellules est tel que les "perméases" pour la méthionine doivent concentrer de façon importante : nous n'avons pas pu faire de mesures avec des densités cellulaires aussi faibles car les conditions expérimentales de dosage de la méthionine endocellulaire auraient exigé des quantités trop importantes de culture pour obtenir un résultat dont on a peu de raison de douter.

Ces deux types de résultats permettent maintenant d'éclairer le mécanisme des expériences de répression en fonction de concentrations croissantes de méthionine ajoutées aux milieux de culture, relatées par Cherest et coll. (1971). Les auteurs s'étaient étonnés du fait que la répression était une fonction croissante de la dose de méthionine exogène car les études antérieures sur les "perméases" incitaient à penser que les conditions expérimentales utilisées étaient telles que le réservoir intracellulaire devait être rempli quelles que soient les doses de méthionine ajoutées au milieu et que la répression n'aurait pas dû être de façon aussi stricte fonction de la concentration en méthionine exogène. Il s'avère ici que les variations des activités enzymatiques, dosées après cultures en milieu synthétique contenant des concentrations croissantes de méthionine, sont reliées à une fonction croissante des concentrations de méthionine endocellulaire libre. Une "courbe de répression" des trois enzymes étudiés peut maintenant être tracée en fonction de la teneur endocellulaire en méthionine (figure IV-3 p. 69). On peut réinterpréter ces expériences de la façon suivante : au temps zéro de l'expérience, lors de l'inoculation des milieux, l'état des enzymes est réprimé : d'une part, l'inoculum provient d'une culture en milieu riche YPGA qui, on l'a remarqué, réprime les enzymes de la voie de biosynthèse de la méthionine (Thèse H. Cherest 1970) : d'autre part, la méthionine ajoutée aux milieux est concentrée très rapidement dans le réservoir cellulaire et doit maintenir l'état réprimé des enzymes. Au cours de la croissance qui suit, la

teneur en méthionine endocellulaire baisse dans certains cas (basses concentrations de méthionine exogène). Le taux de synthèse des enzymes évolue parallèlement à la concentration endocellulaire de méthionine. Un instantané photographique de l'état des enzymes est pris au moment où les cultures atteignent une densité cellulaire correspondant à 360 mg de cellules sèches par litre : la concentration endocellulaire de méthionine libre correspond aux concentrations indiquées sur la figure IV-2 p. 66. On porte les valeurs de concentrations endocellulaires de méthionine en abscisses et les taux de répression publiés par Cherest et coll. (1971) en ordonnées : on obtient alors les courbes de répression des enzymes en fonction de la concentration en méthionine endocellulaire (figure IV-3 p. 69). La sensibilité des réponses du système de régulation à la concentration de méthionine exogène est confirmée par l'examen approfondi de ce qui se passe dans le milieu endocellulaire. La réponse du système de régulation apparaît plus brutale avec la concentration endocellulaire en méthionine qu'avec la concentration exogène. Des expériences, similaires à celles décrites pour la souche 4094-B, ont été réalisées avec la souche CC17-6A qui porte la mutation "eth 2.1". Des courbes, semblables à celles obtenues avec les résultats de l'étude de la souche 4094-B, ont pu être tracées. Une modification intervient ici et elle nous amène à anticiper sur ce qui sera décrit à la fin de ce chapitre. En effet, la souche CC17-6A contient, après culture en milieu synthétique non enrichi en méthionine, une quantité de méthionine libre endocellulaire supérieure à celle présente chez la souche sensible à l'éthionine dont elle est issue par mutation. La courbe de la figure IV-4 p. 70 (c'est le même type de courbe que celle de la figure IV-2 p. 66) part donc d'une ordonnée supérieure. Les concentrations supérieures de méthionine exogène rétablissent un tracé de courbe analogue à celui obtenu avec la souche 4094-B. L'utilisation de ces résultats permet le tracé de courbes de répression pour la souche portant la mutation "eth 2.1" en fonction de la concentration endocellulaire en méthionine (figure IV-5 p. 71). Nous avons réuni dans trois graphiques comparatifs les courbes publiées par H. Cherest et

F I G U R E IV-3 :

Effet de la concentration endocellulaire de la méthionine sur la répression du taux de synthèse de trois enzymes de la voie de la méthionine.

Souche 4094-B milieu synthétique minimum additionné ou non de méthionine.

L E G E N D E

En abscisses : Concentration endocellulaire en L-méthionine exprimée en μ moles par gramme de cellules sèches.

En ordonnées : Pourcentage de répression du taux de synthèse des enzymes.

- (a) sulfite réductase
- (b) A T P sulfurylase
- (c) homocystéine synthétase

NB : Les activités spécifiques dosées dans les extraits bruts de la souche 4094-B cultivée en milieu synthétique minimum sont considérées ici comme niveau de base à partir duquel les taux de répression sont calculés.

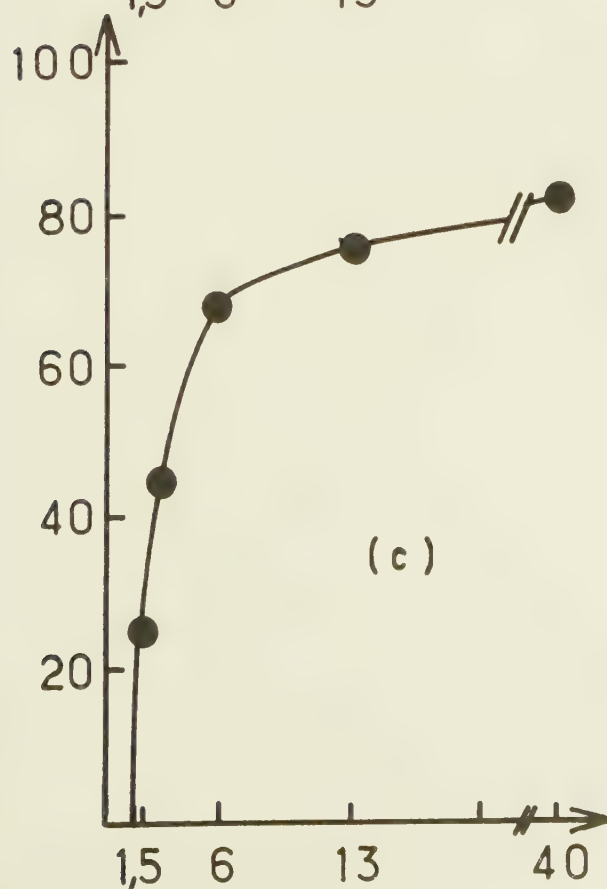
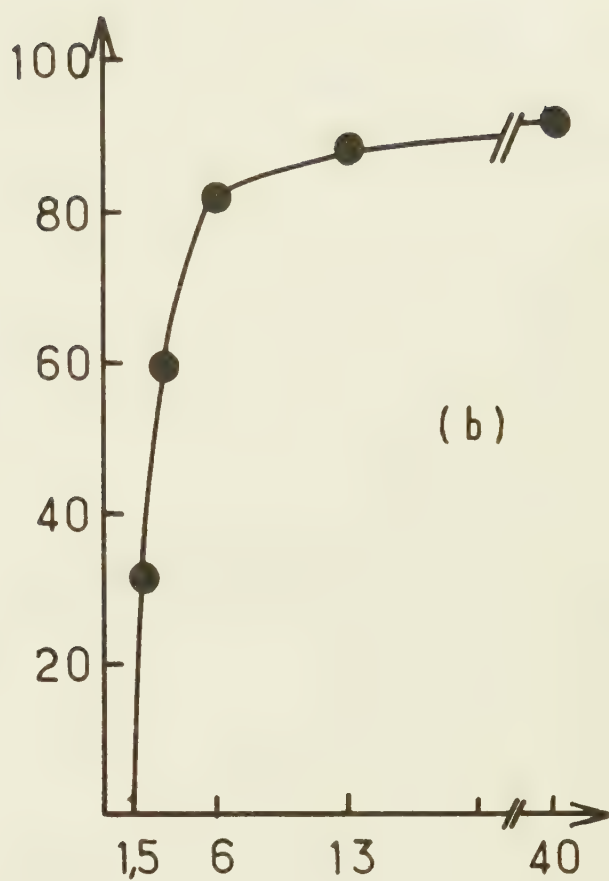
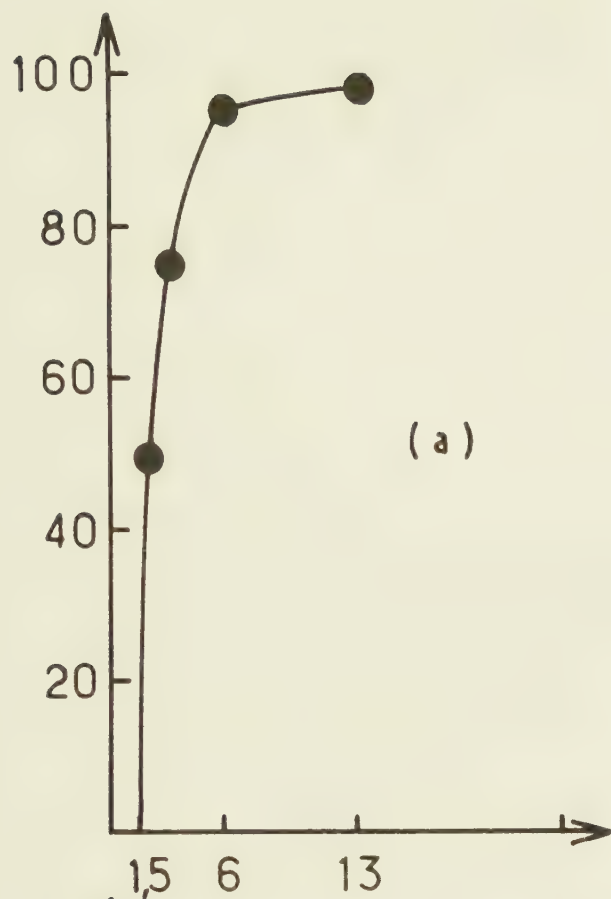


Figure IV 3

F I G U R E IV-4 :

Concentration endocellulaire de L-méthionine libre après
culture en présence de quantités croissantes de DL-méthionine.

Souche C C 17-6A milieu YNB

L E G E N D E

En abscisses : Concentration exocellulaire de la
DL-méthionine exprimée en mM.

En ordonnées : Teneur endocellulaire en L-méthionine
libre exprimée en μ moles par gramme
de cellules sèches.
- ordonnées logarithmiques.

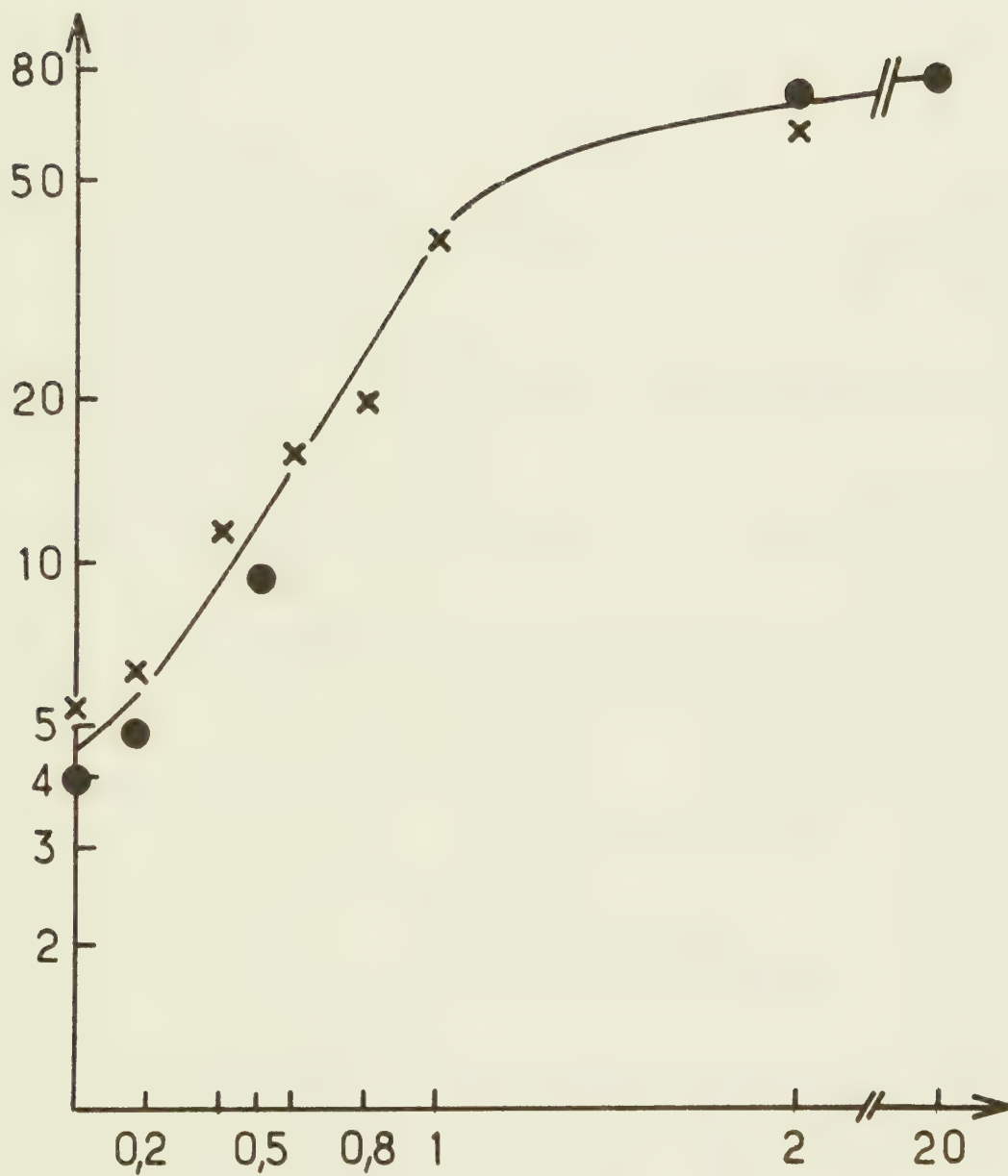


Figure IV 4

F I G U R E I V - 5 :

Effet de la concentration endocellulaire de la méthionine sur la répression du taux de synthèse de trois enzymes de la voie de la méthionine.

Souche C C 17-6A milieu synthétique minimum additionné ou non de méthionine.

L E G E N D E

En abscisses : Concentration endocellulaire en méthionine exprimée en μ moles par gramme de cellules sèches.

En ordonnées : Pourcentage de répression du taux de synthèse des enzymes.

(a) sulfite réductase

(b) A T P sulfurylase

(c) homocystéine synthétase

NB : Les activités spécifiques dosées dans les extraits bruts de la souche C C 17-6A cultivée en milieu synthétique minimum sont considérées ici comme niveau de base à partir duquel les taux de répression sont calculés.

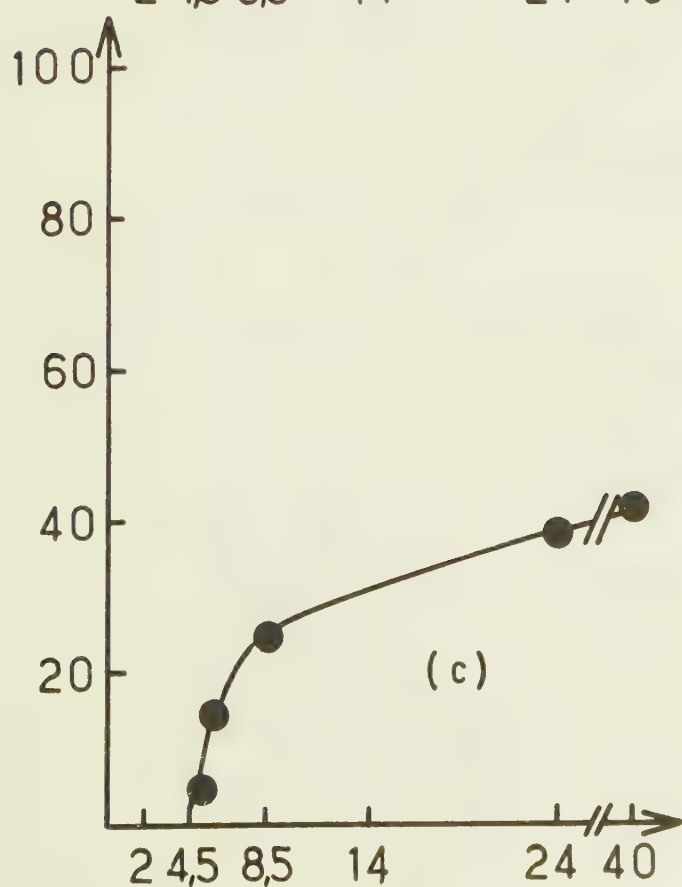
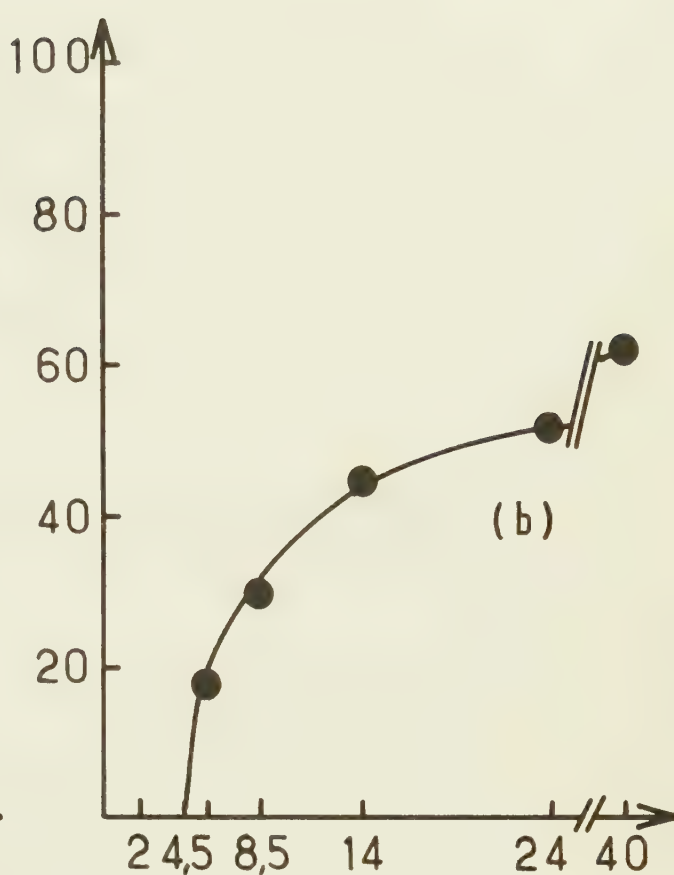
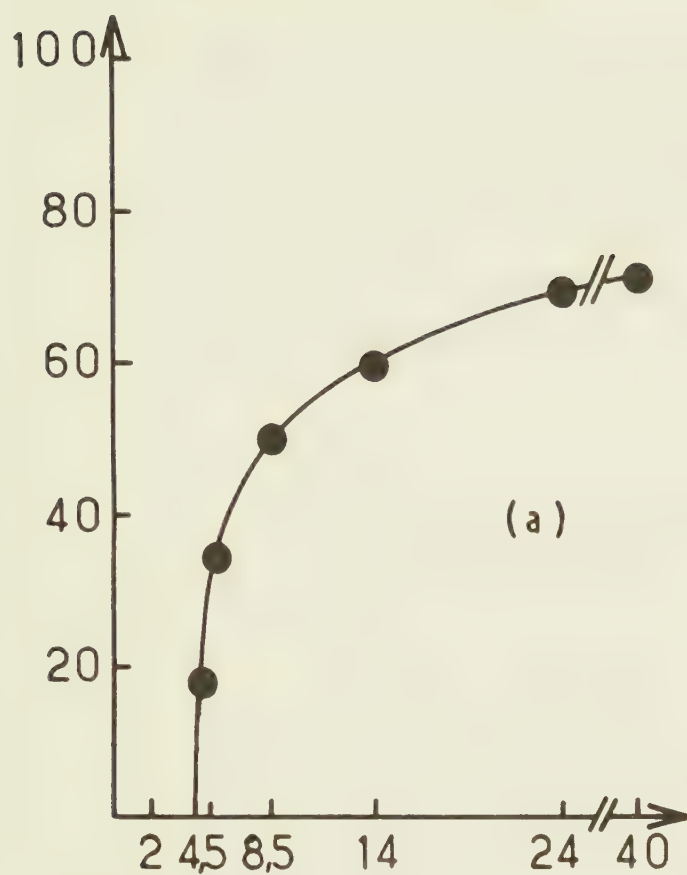


Figure IV 5

coll. (1971) et les nouvelles courbes de répression en fonction de la concentration endocellulaire faites à partir de nos résultats. La comparaison de ces courbes confirme le manque de sensibilité à la méthionine du système de répression modifié par la mutation "eth 2.1" (figures IV-6,7,8 p. 73). Il faut remarquer que, mêmes dans ces conditions, un décalage dans les concentrations de méthionine conduisant à 50% de répression est observé pour les trois enzymes.

IV - 2 - MESURE DE LA CONCENTRATION ENDOCELLULAIRE DE METHIONINE
LIBRE PAR LA METHODE RADIOACTIVE : ETUDE DE LA SOUCHE
4094-B

IV - 2.1 - La méthode radioactive a été appliquée à la souche sauvage dans les conditions décrites dans le chapitre I "Matériel et Méthodes". Les déterminations de méthionine endocellulaire ont été faites à différents moments de la phase de croissance exponentielle ou à une densité cellulaire correspondant à 360 mg de cellules sèches par litre et dans les deux cas après culture en présence de ^{35}S . Le tableau IV-3 p. 74 montre une excellente corrélation entre les chiffres obtenus soit par la méthode radioactive soit par la méthode microbiologique.

IV - 2.2 - Une étude du renouvellement de la méthionine endocellulaire a pu être réalisée grâce à la méthode suivante. La souche sauvage est cultivée en milieu synthétique dépourvu de radioactivité jusqu'à une concentration cellulaire équivalant à 200 mg de cellules sèches par litre de culture ; les cellules sont donc en phase de croissance exponentielle. Une addition de ^{35}S sous forme de sulfate radioactif permet de marquer la méthionine formée par le système biosynthétique cellulaire à partir du sulfate. Des prélèvements de parties aliquotes de la culture permettent la récolte par centrifugation rapide (5000 g - 3 min) des cellules et l'extraction de la méthionine endocellulaire. La figure V-3 p.94 , montre l'évo-

FIGURE IV-6 :

Effet de la concentration endocellulaire (A) ou exocellulaire (B) de méthionine sur la répressibilité du taux de synthèse de la sulfite réductase.

Courbes I : 4094-B

Courbes II : C C 17-6A ("eth 2.1")

milieu synthétique minimum

En abscisses : (A) concentration endocellulaire en méthionine exprimée en μ moles par gramme de cellules sèches.

(B) concentration exocellulaire en méthionine exprimée en mM.

En ordonnées : Pourcentage de répression du taux de synthèse de la sulfite réductase.

FIGURE IV-7 :

idem pour l'A T P sulfurylase

FIGURE IV-8

idem pour l'homocystéine synthétase

RE : Les courbes de type A sont identiques dans leur tracé à celles des figures IV-3 et IV-5 : les points expérimentaux, seuls, ont été omis afin d'en simplifier l'examen.

Les courbes de type B sont issues d'une publication de Cherest et coll. (1971)

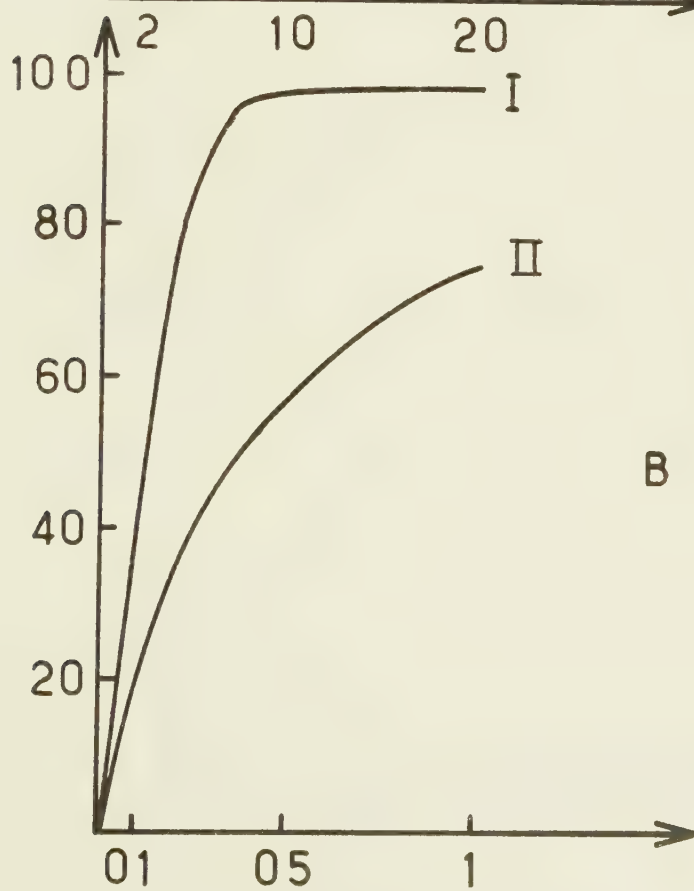
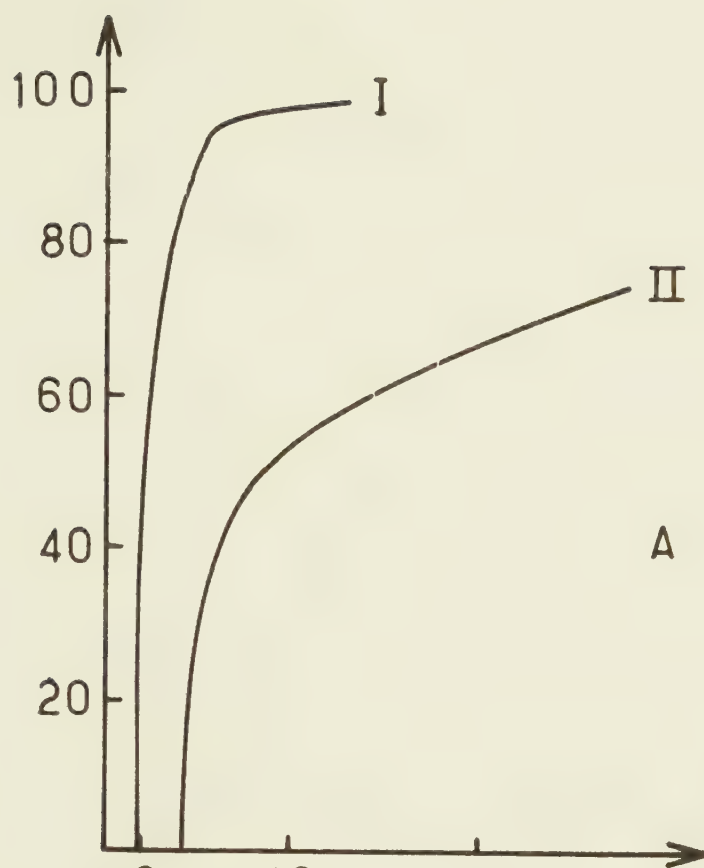


Figure IV 6

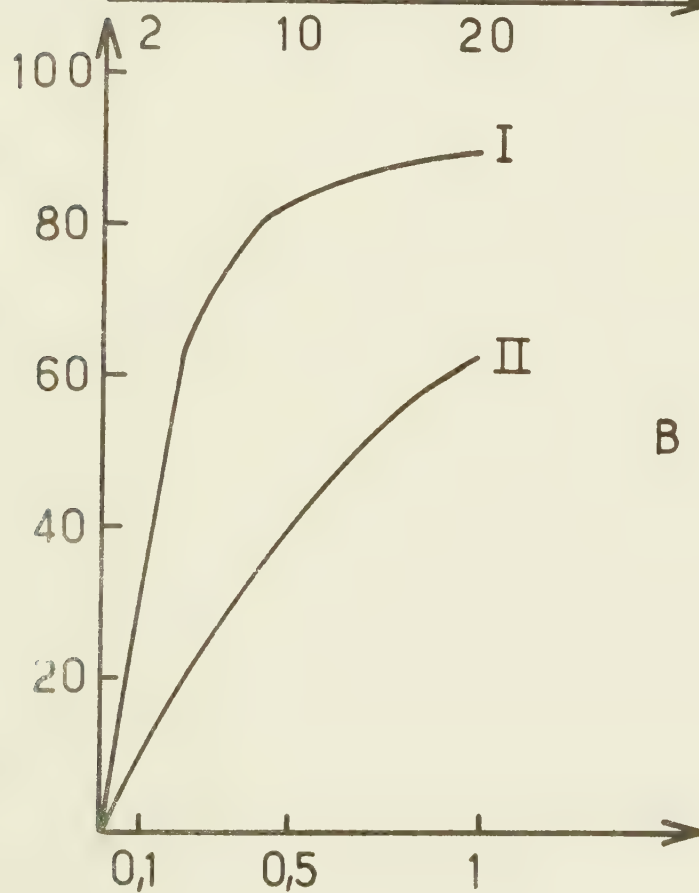
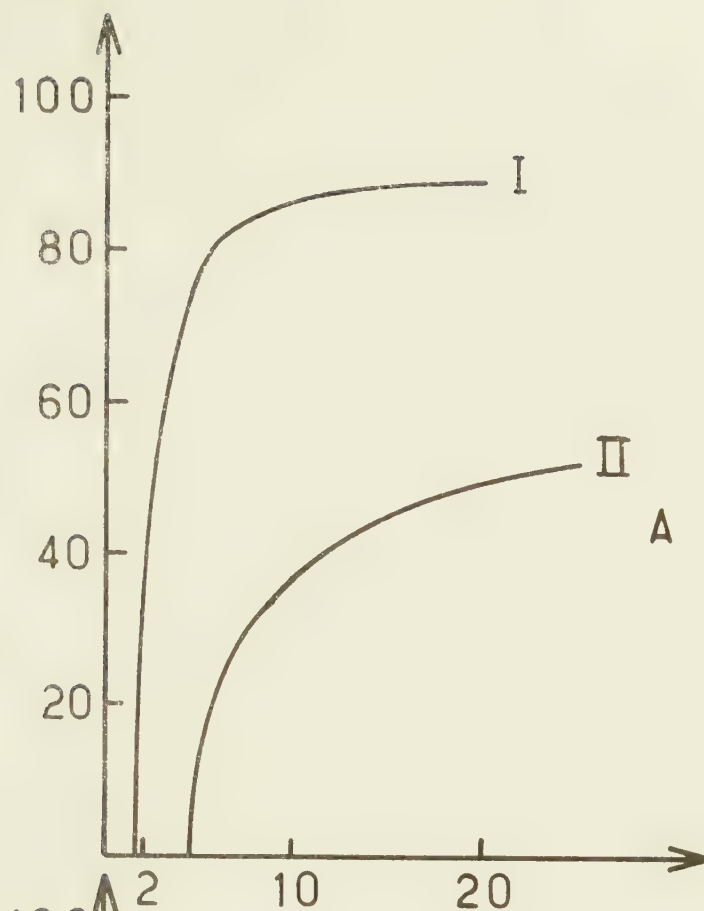


Figure IV 7

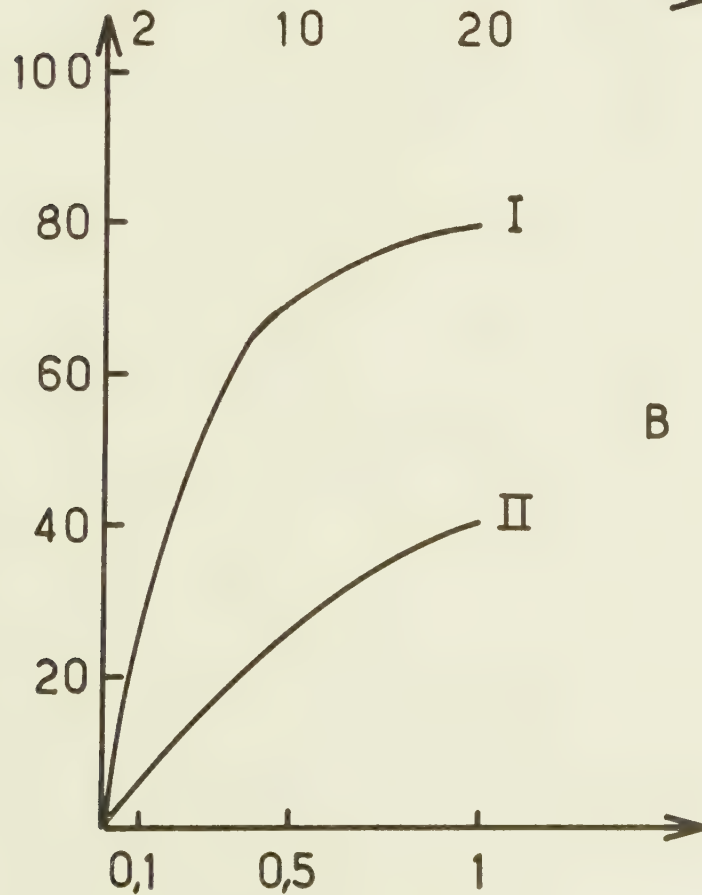
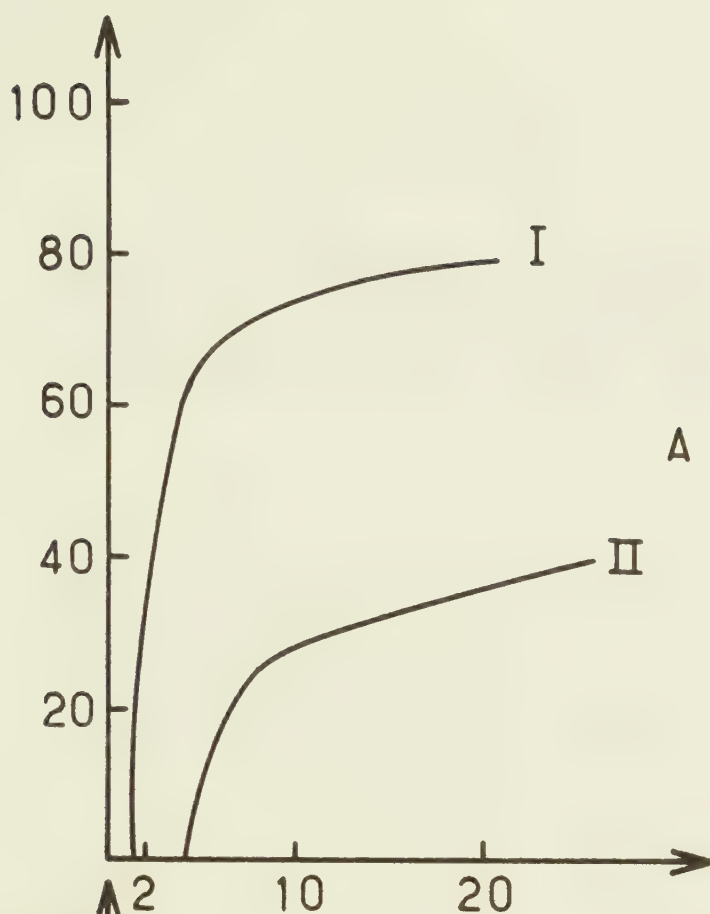


Figure IV 8

TABLEAU IV-3

Teneur en méthionine libre endocellulaire chez la
souche 4094-B durant la phase exponentielle de crois-
sance en milieu synthétique minimum YNB

Densité cellulaire à laquelle la mesure a été effectuée en mg de cellules sèches/litre	Teneur en méthionine endocellulaire libre en μ moles/g de cellules sèches	
	Méthode radioactive	Méthode microbiologique
100	1,22	-
130	1,45	-
175	1,21	-
216	1,65	-
250	-	1,40
280	-	1,30
310	-	1,40
430	-	1,50
440	1,30	-

lution de la teneur en méthionine endocellulaire radioactive en fonction du temps, donc de la méthionine biosynthétisée à partir de l'addition de SO_4^{35}S radioactif. On constate que 5 minutes après l'addition de sulfate radioactif le tiers de la méthionine endocellulaire a été renouvelé. Ceci corrobore le résultat que l'on peut calculer à partir de la teneur globale en méthionine (voir chapitre II et ce chapitre) et de la teneur permanente en méthionine libre (ce chapitre, au début). Tout se passe comme si le "réservoir" de méthionine libre - $1,5 \mu$ moles/g de cellules sèches - tout en restant constant devait fournir 30μ moles en une génération cellulaire soit 2 heures. Il doit donc se renouveler $\frac{30}{1,5} = 20$ fois en 2 heures soit 1 fois en 6 minutes.

Autrement dit une capacité de production $\frac{30}{120} = 0,25 \mu$ moles/min/g de cellules sèches assure les besoins en méthionine de la cellule. Dès lors, il est tout à fait logique que 5 minutes après addition de ^{35}S le tiers de la méthionine soit déjà marqué.

IV - 3 - ETUDE DE SOUCHES SENSIBLES A L'ETHIONINE ET D'ORIGINES DIFFERENTES

Six souches d'origines différentes, portant des déficiences variées mais toutes sensibles à l'éthionine, ont été étudiées suivant le protocole défini dans le paragraphe IV-1.1. La teneur endocellulaire en méthionine libre varie d'une souche à l'autre sans toutefois se trouver hors de la zone de $0,5 \mu$ moles à 2μ moles par gramme de cellules sèches (tableau IV-4 p. 76).

IV - 4 - ETUDE DES SOUCHES RESISTANT A L'ETHIONINE

L'étude des concentrations endocellulaires en méthionine chez différents mutants résistant à l'éthionine a été effectuée selon les principes décrits en IV-1.1 et en IV-2.1. Cette étude a permis de les classer en trois catégories :

TABLEAU IV-4

Teneur endocellulaire en méthionine libre de différentes
souches sensibles à l'éthionine après culture en milieu
synthétique minimum YNB

Souches étudiées	Génotype	Teneur endocellulaire en méthionine libre exprimée en μ moles/g cellules sèches
4094-B	ade ⁻ ura ⁻	1,55 (1)
199M ₁	try ⁻ his ⁻ ade ⁻ leu ⁻ lys ⁻ arg ⁻	0,55
CM8-34D	try ⁻ leu ⁻ ileu ⁻ ade ⁻ ura ⁻	1
CM8-15B	leu ⁻ ileu ⁻ ade ⁻ ura ⁻	0,8
S-288 C	pas d'auxotrophies	0,5
PM-100	pas d'auxotrophies	0,6
264-2B	pas d'auxotrophies "perméase" modifiée	1,7

(1) Il s'agit ici de la moyenne de 10 expériences.

- 1/ Mutants résistants à teneur endocellulaire légèrement plus élevée que celle observée chez les souches sensibles à l'éthionine.
- 2/ Mutants résistants à teneur endocellulaire très élevée.
- 3/ Mutants résistants à teneur endocellulaire analogue à celle observée chez les souches sensibles à l'éthionine.

Une étude de différentes souches portant des allèles différents de résistance au locus E T H 2 a montré qu'on retrouve la variabilité, citée ci-dessus, au sein de ce même locus.

IV - 4.1 - Mutants résistants à teneur endocellulaire en méthionine légèrement plus élevée que celle observée chez les souches sensibles à l'éthionine.

La souche 4094-B 6, très résistante à l'éthionine (20 mM), sélectionnée par transfert en masse sur des milieux liquides contenant de l'éthionine appartient à ce groupe. L'analyse génétique a montré qu'elle portait deux mutations qui ont été séparées et que l'on a nommées "eth 3.1" et "eth 4.1" (voir paragraphe III). 4094-B 6 montre une concentration en méthionine endocellulaire de $3,2 \mu$ moles/g de cellules sèches alors que la souche 4094-B dont elle est issue par deux mutations successives, contient $1,5 \mu$ moles/g de cellules sèches. La concentration a donc été seulement multipliée par 2 par rapport à la souche isogénique sensible à l'éthionine. La souche portant la mutation "eth 3.1" montre un niveau analogue : $2,6 \mu$ moles et $3,2 \mu$ moles par gramme de cellules sèches dans deux expériences indépendantes. Sa résistance est cependant plus faible que celle de 4094-B 6 dont elle est issue (voir résultats tableau IV-5 p. 78).

TABLEAU IV-5

Teneur endocellulaire en méthionine libre chez différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* résistante à l'éthionine. Les souches isogéniques sensibles sont indiquées à titre de comparaison. Milieu synthétique minimum YNB

Souches	Résistance à l'éthionine	Teneur en méthionine libre en μ moles/g cellules sèches
4094-B	sensible	1,5 - 1,3 ⁽¹⁾
4094-B6	résistante	3,2
CH 71-5A	résistante	2,6 - 3,1
4094-S ₄	résistante	14
4094B-E10	résistante	14 - 15,3 ⁽¹⁾
4094B-S13	résistante	1,7
CY 16-10C	résistante (anisogénique)	0,7

(1) Mesures obtenues par la méthode radioactive après culture prolongée en présence de sulfate ³⁵S.

IV - 4.2 - Mutants résistant à l'éthionine à teneur très élevée en méthionine endocellulaire

Il s'agit de mutants très résistants à l'éthionine (résistant à 20 mM en boîte gélosée). Les souches portant les mutations "sem 4.1" et "eth 10.1" (voir paragraphe III) contiennent environ 15 μ moles de méthionine libre par gramme de cellules sèches : ceci multiplie par un facteur 10 la concentration endocellulaire trouvée chez la souche sauvage isogénique 4094-B (voir résultats tableau IV-5 p. 78). La mesure de la teneur en méthionine par la méthode radioactive après culture prolongée en ^{35}S (voir "Matériel et Méthodes") a été faite avec la souche 4094-B.E10 (portant "eth 10.1") : elle confirme l'ampleur de la différence observée.

IV - 4.3 - Mutants résistants ayant une teneur endocellulaire en méthionine analogue à celle observée chez les souches sensibles

Il s'agit, d'une part, de la souche qui porte la mutation "eth 4.1" (CY 16-10C) et d'autre part, de la souche 4094 B S13 sélectionnée pour sa résistance à la sélénométhionine (cette mutation entraîne également la résistance à l'éthionine). C'est une mutation monogénique. Ces deux souches ont des teneurs endocellulaires en méthionine libre comprises dans la plage observée pour les souches sensibles à l'éthionine (tableau IV-5 p. 78 et comparer au tableau IV-3 p. 74).

IV - 4.4 - Etude particulière des souches portant des mutations au locus E T H 2

L'étude des mutations obtenues au locus E T H 2 a été entreprise par H. Cherest qui a étudié la mutation "eth 2.1". Les souches portant cette mutation sont moyennement résistantes à l'éthionine (chapitre III) et sont caractérisées par une teneur de 5 μ moles de méthionine libre par gramme de cellules sèches. M. Masselot (1972) a continué l'étude du locus E T H 2 et a obtenu

par mutagénèse des allèles différents qui entraînent une résistance plus ou moins grande à l'éthionine pour les souches qui les portent. Les souches portant l'allèle "eth 2.2" présentent des teneurs élevées en méthionine endocellulaire (le tableau IV-6 p. 81 donne les chiffres obtenus pour des souches anisogéniques ou isogéniques portant ces allèles) : le niveau de méthionine endocellulaire est toujours dix fois supérieur au niveau observé chez la souche sauvage. La souche 199M₁-102 a été également comparée à l'aide de mesures radio-actives à la souche 199-M₁ dont elle est issue.

Là aussi, le facteur 10 se retrouve comme chez 4094-B-E10 (tableau IV-6 p. 81). Enfin les souches, portant les allèles "eth 2.4", "eth 2.5", résistant à l'éthionine ont un niveau de méthionine endocellulaire qui ne les distingue pas nettement des souches sauvages (tableau IV-6 p. 81).

IV - 4.5 - Etude de la combinaison, au sein d'une même souche, de plusieurs mutations indépendantes conférant la résistance

- Combinaison génétique "eth 3.1" - "eth 4.1"

Cette combinaison est réalisée chez la souche 4094-B.6 : sa résistance est très supérieure à celle de chacune des souches qui portent soit "eth 3.1" seul, soit "eth 4.1" (résistance à 20 mM d'éthionine pour la souche 4094-B 6 contre 2 mM pour la souche portant "eth 3.1" et 0,5 mM pour la souche portant "eth 4.1"). Par contre, il n'y a pas de différence notable au niveau des concentrations endocellulaires en méthionine (voir tableau IV-7 p. 82) entre 4094-B.6 et la souche CH 71-5A ("eth 3.1").

- Combinaison "eth 1.1" - "eth 2.1" : On sait que "eth 1.1" est une mutation qui confère à la souche qui la porte aucune particularité la distinguant d'une souche sensible à l'éthionine (H. Cherest, 1966). Par contre, la combinaison "eth 1.1", "eth 2.1" renforce la résistance conférée par la mutation "eth 2.1". La souche CH 82-7D portant les deux mutations, plus résistante que

TABLEAU IV-6

Teneur endocellulaire en méthionine libre chez différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* portant des mutations allèles au locus ETH2 et souches isogéniques sensibles correspondantes. Milieu synthétique minimum YNB

Souches	Résistance à l'éthionine	Teneur en méthionine libre en μ moles/g cellules sèches
199M ₁	sensible	0,5 - 0,6 - 0,3 ⁽¹⁾
199M ₁ -102	résistante isogénique de 199M ₁ - eth2.2	14 - 16,5 - 18 - 8 ⁽¹⁾
199M ₁ -21	résistante isogénique de 199M ₁ - eth2.3	12,5 - 11,5
CM53-24C	résistante - eth2.2	9,3
CM53-6A	résistante - eth2.2	8
CM8-34D	sensible	1
CM8-34D103	résistante isogénique de CM8-34D - eth2.4	1,1
CM8-15B	sensible	0,8
CM8-15B 1	résistante isogénique de CM8-15B - eth2.5	0,9
CC17-6A	résistante - eth2.1	5

(1) Mesures obtenues par la méthode radioactive

TABLEAU IV-7

Teneur endocellulaire en méthionine libre de souches portant la combinaison de deux facteurs conférant chacun la résistance à l'éthionine. Milieu synthétique minimum YNB

Souches	Allèle de résistance à l'éthionine	Teneur en méthionine endocellulaire libre en μ moles/g cellules sèches
CH82-7A	eth1.1	1,85
CC17-6A	eth2.1	5
CH71-5A	eth3.1	2,8
CY16-10C	eth4.1	0,5
CH82-7D	eth1.1 - eth2.1	5,3
4094-B6	eth3.1 - eth4.1	3,2
CJ1-2B	eth3.1 - eth2.1	9,8
CJ1-1A	eth3.1 - eth2.1	9,8

TABLEAU IV-8 - Excrétion de méthionine par diverses souches cultivées en milieu synthétique
minimum YNB

Souches (1)	Résistance (R) ou Sensibilité (S) à l'éthionine (2)	Excrétion		Teneur endocellu- laire en méthionine en μ moles/g de cel- lules sèches (5)	Total (4)+(5) (6)
		en μ g/litre de culture (3)	en μ moles/g de cellules sèches (4)		
4094-B	S	0	0	1,5	1,5
4094B-S4	R	300	6	14	20
4094B-E10	R	380	7,5	14,5	22
199M ₁ -21	R	260	5	12	17
199M ₁ -102	R	450	9	16	25
CM53-24C	R	500	9	9,3	18,3
4094B-S13	R	0	0	1,7	1,7
CM8-34D103	R	0	0	1,1	1,1
CM8-15B1	R	0	0	0,9	0,9
CH71-5A	R	0	0	3	3
CC17-6A	R	0	0	5	5

CC 17-6A qui, elle, ne porte que la mutation "eth 2.1", ne se différencie pourtant pas de celle-ci quant à la concentration endocellulaire en méthionine libre (tableau IV-7 p. 82).

- Combinaison "eth 2.1" - "eth 3.1" : De nouveau la combinaison de deux facteurs de résistance au sein de la même souche confère à celle-ci une résistance plus importante. Cependant, cette combinaison se distingue des précédentes par le niveau de méthionine endocellulaire élevé qu'elle entraîne chez la souche qui la porte : la teneur de celle-ci représente au moins la somme des teneurs endocellulaires des souches monogéniques correspondantes (tableau IV-7 p. 82).

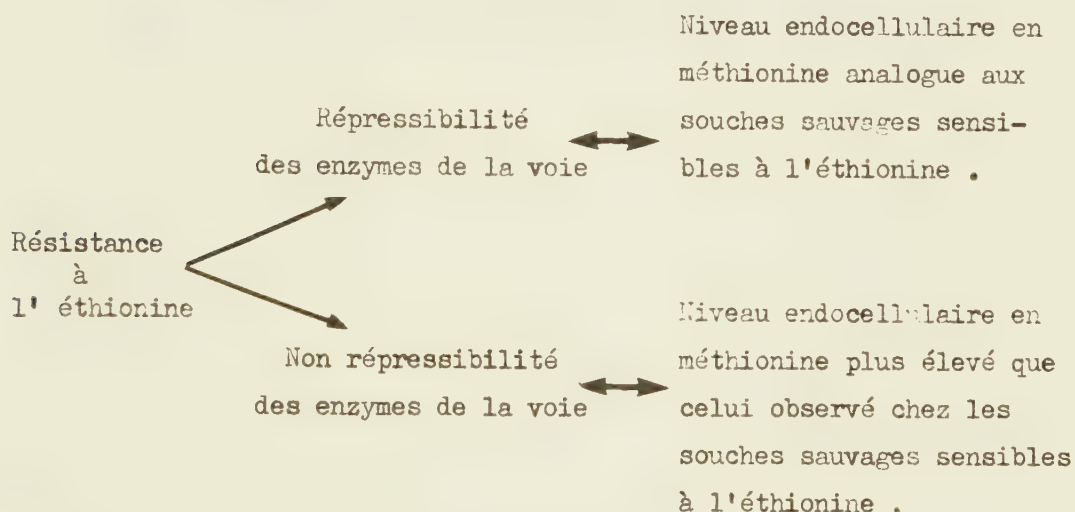
IV - 4.6 - Etude de l'excrétion de méthionine par les souches à teneur élevée en méthionine libre endocellulaire

L'étude de la présence de méthionine dans les milieux de culture des souches ayant une teneur en méthionine endocellulaire élevée a permis de mesurer l'excrétion d'une partie de la méthionine endocellulaire. Les quantités excrétées figurent dans le tableau IV-8 p. 83. Elles peuvent paraître faibles si on les rapporte au litre de culture (colonne 3). Il est plus logique de les rapporter au gramme de cellules sèches (colonne 4). On constate alors que la méthionine excrétée constitue une partie non négligeable de celle présente à l'intérieur de la cellule. Par ailleurs, les souches à basse teneur en méthionine n'excrètent pas de quantités décelables. La somme des colonnes (4) et (5) représente la production globale de méthionine (colonne 6) : les chiffres obtenus dans cette colonne accentuent encore les différences observées entre souches sauvages sensibles à l'éthionine et souches à forte résistance à l'éthionine, telles que celles portant les mutations "sem 4.1", "eth 10.1", "eth 2.2", "eth 2.3".

IV - 5 - CONCLUSION

Dans le chapitre précédent , une corrélation avait pu être établie entre la résistance à l'éthionine et l'absence de répressibilité de la synthèse de l'homocystéine synthétase et de l' A T P sulfurylase . Quelques souches résistantes échappaient à cette corrélation (4094-B.S13 et souches portant les mutations "eth 2.4", " eth 2.5 ").

Dans ce chapitre , on retrouve une corrélation entre la résistance à l'éthionine et un niveau plus ou moins élevé de méthionine endocellulaire . Quelques souches résistant à l'éthionine échappent encore à cette corrélation : il est très intéressant de noter que ces mêmes souches résistantes qui ont des niveaux de méthionine endocellulaire analogues à ceux des souches sensibles sont aussi celles qui échappent à la corrélation exprimée dans le chapitre II (4094-B S13 et souches portant les mutations "eth 2.4", "eth 2.5") . L'ensemble de ces résultats pourrait se résumer ainsi :



Dans le prochain chapitre , nous allons nous efforcer de souligner l'intérêt des teneurs élevées en méthionine endocellulaire des souches résistantes et d'en suggérer l'origine .

CHAPITRE V

INTERET PHYSIOLOGIQUE ET ORIGINE DES TENEURS
ELEVES EN METHIONINE DES MUTANTS RESISTANT A L'ETHIONINE

V - 1 - INTERET PHYSIOLOGIQUE DES TENEURS ELEVEES OBSERVEES CHEZ
LES SOUCHES RESISTANT A L'ETHIONINE

Quand on ajoute de l'éthionine à une culture de la souche sensible 4094-B en milieu synthétique, on constate immédiatement un ralentissement du temps de génération se traduisant par un tracé linéaire de la courbe de croissance (figure V 1 p. 88) et un appauvrissement net de la teneur endocellulaire en méthionine (figure V-2 p. 89). La teneur endocellulaire en méthionine est mesurée au cours de ces expériences par la méthode radioactive (par cultures avec le milieu synthétique dont le sulfate est radioactif) comme dans le chapitre II. Il est en effet exclu de recourir aux méthodes microbiologiques de mesure puisque les extraits bouillis obtenus contiennent de l'éthionine et que celle-ci inhibe la bactérie testrice.

L'une des causes invoquées pour expliquer la croissance linéaire d'un microorganisme se développant habituellement de façon binaire exponentielle, est la raréfaction d'un aliment nutritif du milieu de croissance. D.H. Hayes (1971) s'est inspiré de ce schéma pour expliquer la croissance linéaire d'E.coli cultivé en présence d'éthionine ; le facteur limitant, dans ce cas, serait l'absence, au sein de la cellule, de ribosomes 70 S incapables de se former en présence d'éthionine. Chez Sacch.cerevisiae il nous paraît plausible d'expliquer la croissance linéaire observée par la raréfaction de la méthionine dans le milieu endocellulaire ; quel que soit le mécanisme exact de cette baisse, il est certain que l'atteinte des disponibilités intracellulaires en méthionine a pour conséquence une synthèse diminuée des protéines et donc une croissance ralentie comme dans le cas banal d'une culture limitée en glucose.

Si l'addition d'éthionine est maintenant accompagnée d'une addition de méthionine, la croissance n'est pas perturbée (figure V-1 p. 88) bien que l'éthionine pénètre effectivement dans la cellule. En effet, la présence de la méthionine n'inhibe que très légèrement la pénétration de l'éthionine dans la cellule : le tableau V-1 p. 90

FIGURE V-1

Croissance de la souche 4094-B

0 : en milieu synthétique

I : en milieu synthétique après addition
(flèche) d'éthionine 0,4 mM.

II : en milieu synthétique après addition
(flèche) d'éthionine 0,4 mM et de
méthionine 0,2 mM.

En abscisses : Temps en heures

En ordonnées : Densité optique à 650 nm sous 1 cm
de trajet optique.

en A : ordonnées logarithmiques.

en B : ordonnées normales pour la courbe I
seulement.

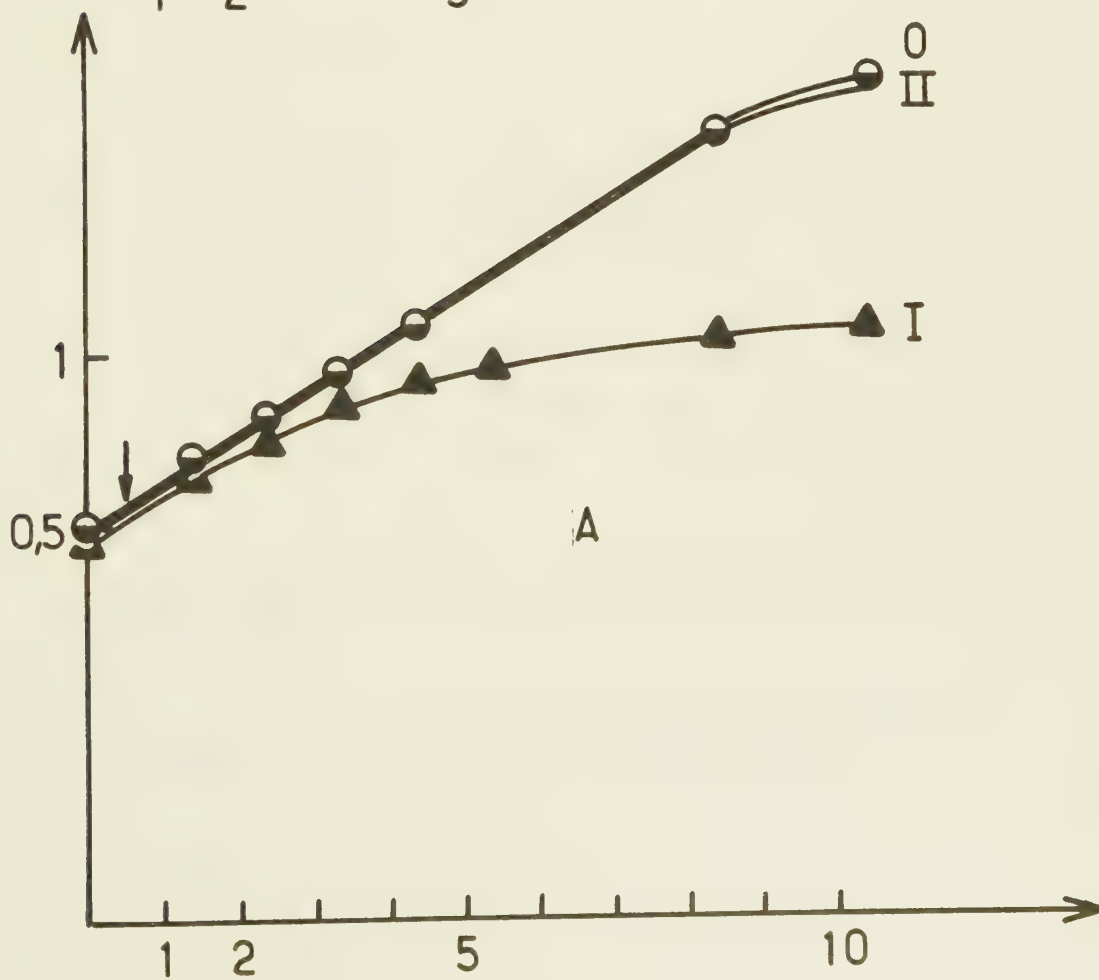
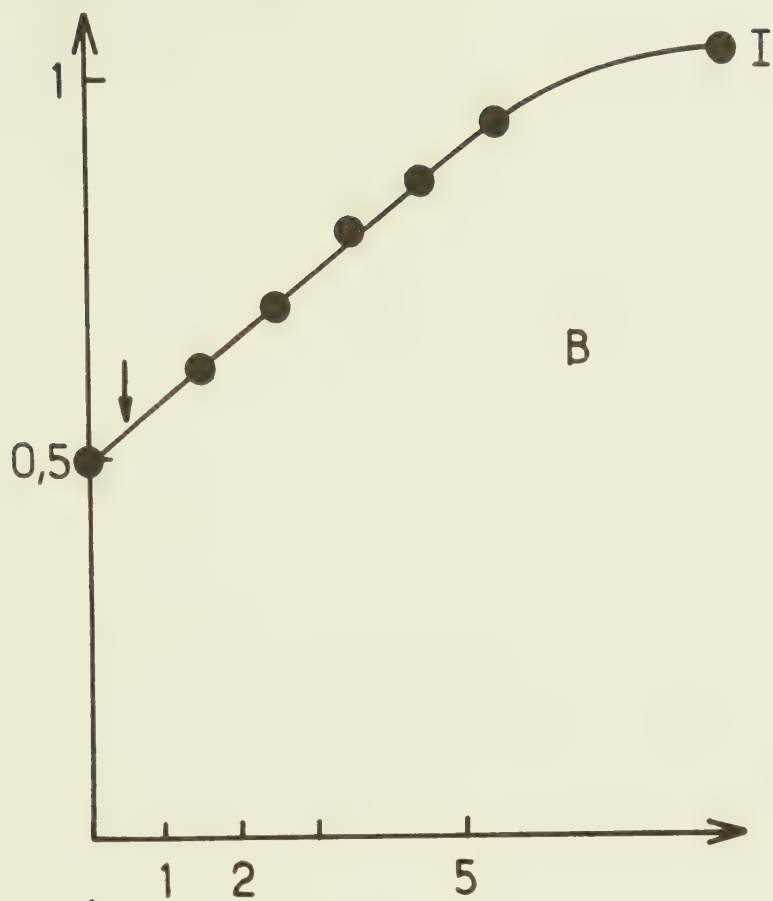


Figure V 1

F I G U R E V-2

Evolution, après addition au milieu de culture de 0,4 mM de DL- éthionine, de la teneur endocellulaire en méthionine marquée dans le ^{35}S chez la souche sauvage cultivée en milieu synthétique minimum.

L E G E N D E

En abscisses : Temps en heures. Le temps 0 coïncide avec l'addition de l'éthionine au milieu de culture.

En ordonnées logarithmiques : Teneur en méthionine radioactive exprimée en μ moles par gramme de cellules sèches.

La droite tracée en trait plein est celle obtenue par le calcul défini dans le chapitre II et matérialise l'effet de la méthionine.

La courbe tracée en pointillé est celle obtenue par l'action de l'éthionine (points matérialisés par ●).

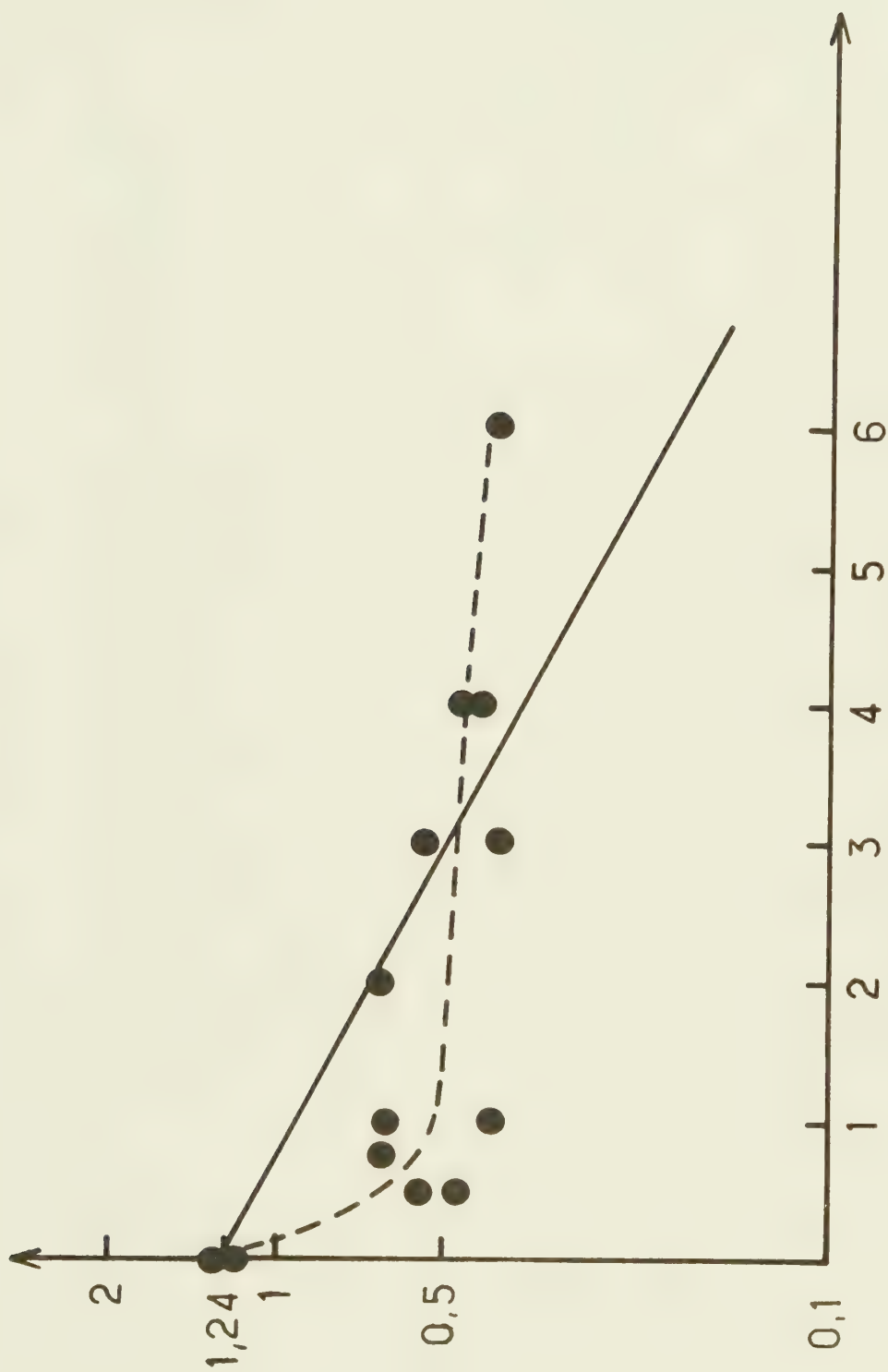


Figure V2

TABLEAU V-1 -- Souche 4094-B concentration endocellulaire en éthionine libre après addition d'éthionine 0,4mM accompagnée ou non de doses variables de méthionine - Milieu synthétique minimum YNB

L'éthionine utilisée est marquée uniformément dans le carbone.

La concentration endocellulaire d'éthionine est exprimée en µmoles par gramme de cellules sèches.

Temps écoulé après addition ci- contre (en minutes)	A d d i t i o n d e		
	Ethionine ¹⁴ C 0,4 mM	Ethionine ¹⁴ C 0,4 mM + méthionine 0,2 mM	Ethionine ¹⁴ C 0,4 mM + méthionine 0,4 mM
15	16	9,6	7,2
25	24	13,2	12
35	28	18	16

permet de constater que l'éthionine est bien présente dans la cellule et donc susceptible de jouer le rôle qu'elle jouait dans l'expérience précédente. Mais la méthionine est aussi présente grâce aux mêmes mécanismes de perméabilité et peut subvenir aux besoins cellulaires en méthionine pour assurer une croissance exponentielle normale.

La chute transitoire qui se produit chez une souche résistante à teneur élevée en méthionine (4094-B.E10) après addition d'éthionine est insuffisante pour amener la teneur endocellulaire en méthionine à des niveaux susceptibles de ralentir la croissance. Cette élévation "naturelle" de la teneur en méthionine endocellulaire chez 4094-B.E10 joue, en présence d'éthionine, le même rôle que l'élévation artificielle en méthionine endocellulaire qui résulte de l'addition simultanée de méthionine à la souche 4094-B.

On voit donc tout l'intérêt que représente pour les souches résistantes, la présence d'une teneur élevée en méthionine. On voit également surgir l'explication possible de certains mutants résistant à l'éthionine dont la teneur en méthionine endocellulaire n'est pas modifiée par rapport à la souche sauvage (mutations "eth 2.4", "eth 2.5" "eth 2.7"). Si ces mutants sont insensibles à cet effet rapide de l'éthionine sur la biosynthèse endocellulaire de méthionine, ce phénomène peut constituer l'explication de la résistance. M. Masselot a récemment confirmé ce point de vue en étudiant l'action de l'éthionine sur une souche portant la mutation "eth 2.7" : la concentration en méthionine endocellulaire ne subit pas de baisse notable chez une souche mise en présence d'éthionine alors que la souche sauvage isogénique se comporte tout-à-fait comme la souche 4094-B (communication personnelle).

V - 2 - SIGNIFICATION DES TENEURS ELEVEES EN METHIONINE

Lorsque dans une chaîne de biosynthèse, un intermédiaire métabolique est en excédent chez une souche de microorganisme dérivée de la souche sauvage par une mutation X, on peut expliquer cette teneur importante par deux mécanismes qui sont :

1/ soit un blocage plus ou moins absolu dans la réaction qui utilise ce métabolite. C'est le cas classique du gène de structure modifié de telle façon que l'enzyme synthétisé est inactif : le substrat de l'enzyme est alors accumulé. Ce sont les exemples connus chez E.coli concernant la voie de biosynthèse de l'arginine, chez Sacch.cerevisiae concernant la voie des purines.

2/ soit une dérégulation de la synthèse des enzymes actifs dans des étapes situées dans la chaîne de biosynthèse soit du métabolite final, soit même de certains métabolites intermédiaires : des modifications intervenues dans le système de régulation conduisent à une synthèse accrue des enzymes et permettent une synthèse excédentaire des métabolites de la chaîne considérée : les exemples de surproduction de tryptophane, tyrosine, lysine chez les bactéries illustrent ce mécanisme.

D'autres mécanismes peuvent également conduire à une teneur élevée en un métabolite : ce sont, soit une diminution de perméabilité cellulaire soit une désenbilisation d'un enzyme soumis à rétro-inhibition. Nous avons écarté l'examen de ces deux mécanismes puisque les souches étudiées n'étaient pas modifiées dans leur perméase méthionine et que les mécanismes de rétro-inhibition semblent ne jouer aucun rôle dans la régulation de la biosynthèse de la méthionine chez Sacch.cerevisiae (chapitre II).

Nous avons constaté chez certains mutants résistant à l'éthionine une teneur élevée en méthionine. Cette teneur élevée est-elle le résultat d'une surproduction ou d'une accumulation ? Les résultats et les spéculations qui vont suivre, s'ils ne permettent pas de répondre complètement à cette question, orientent néanmoins les recherches dans deux voies qui pourraient s'avérer fructueuses.

V - 2.1 - Comparaison du renouvellement de la méthionine endocellulaire chez 4094-B et chez 4094-B.E10

Dans le chapitre IV, les résultats exposés ont permis de constater un renouvellement rapide de la méthionine endocellulaire chez la souche 4094-B. Ce renouvellement rapide est observé avec une souche dont la teneur en méthionine est dix fois moins élevée que celle observée chez la souche 4094-B.E10, résistant à l'éthionine. Dans ce dernier cas et à cause précisément de cette teneur élevée, nous nous sommes demandés si le renouvellement de la méthionine endocellulaire était aussi rapide que celui observé chez la souche 4094-B. La figure V-3 p. 94 illustre les résultats du marquage radioactif de la méthionine endocellulaire chez la souche 4094-B.E10, en fonction du temps après addition de ^{35}S sous forme de $\text{SO}_4^{=}$ au temps 0. La courbe obtenue avec 4094-B a été également tracée. Nous constatons que les deux courbes coïncident si les ordonnées utilisées sont dans le rapport 1/10. Ce rapport représente approximativement le quotient des teneurs endocellulaires en méthionine des deux souches 4094-B et 4094-B.E10. Le tableau V-2 p. 95, donnant le rapport des teneurs en méthionine marquée après des temps d'incubation croissants, illustre d'une autre façon, l'évolution semblable chez les deux souches, du renouvellement de la méthionine endocellulaire.

V - 2.2 - Surproduction

Ces résultats pourraient s'expliquer effectivement par une surproduction dans la voie de biosynthèse de la méthionine.

On sait que la souche 4094-B doit, pour faire une génération cellulaire, synthétiser environ 30μ moles de méthionine en deux heures alors que la souche 4094-B.E10 doit, elle, synthétiser 45μ moles dans le même temps (voir chapitre II). Ceci exige chez la souche 4094-B une capacité de production de la méthionine de $0,25 \mu$ mole /minute/gramme de cellules sèches contre $0,35 \mu$ mole /minute/gramme de cellules sèches chez la souche 4094-B.E10. Il y a effectivement une production accrue de méthionine chez 4094-B.E10:

FIGURE V-3

Renouvellement de la méthionine endocellulaire en fonction du temps.

Souche 4094-B

Souche 4094-B.E10

LEGENDE

En abscisses : Temps exprimé en minutes

En ordonnées : Teneur endocellulaire en méthionine radioactive exprimée en μ moles par gramme de cellules sèches, les unités choisies sont dans un rapport 1 à 10.



Figure V 3

TABLEAU V-2 - Renouvellement de la méthionine endocellulaire en fonction du temps chez 4094-B et 4094-B.E 10. Milieu synthétique minimum à basse teneur en $\text{SO}_4^=$

Les quantités synthétisées après addition de $\text{SO}_4^=$ radioactif sont exprimées en $\mu\text{moles/gramme}$ cellules sèches

Temps écoulé après addition de S^{*}_{35} en minutes	Teneur en méthionine radioactive en μmoles par gramme de cellules sèches		Rapport " 4094 B.E 10 " " 4094B "
	4094-B	4094-B.E 10	
5	0,507	3,980	7,85
10	0,630	5,120	8,12
16	0,790	6,960	8,80
20	0,840	7,700	9,15
30	1,000	8,700	8,70

une surproduction de $0,10 \mu$ mole par minute et par gramme de cellules sèches. Cependant, s'il apparaît possible que la "productivité méthionine" de la souche 4094-B puisse assurer en 5 minutes le marquage du tiers de la méthionine endocellulaire dans l'expérience de renouvellement, il est difficile d'admettre que la "productivité méthionine" de la souche 4094-B.E10 calculée à l'aide des considérations ci-dessus, puisse assurer le renouvellement du tiers de la teneur endocellulaire de cette souche en 5 minutes. En effet, le calcul de renouvellement pour 4094-B donne approximativement en 5 minutes :

$$\frac{5 \times 0,25^*}{1,3 + 5 \times 0,25^*} \times 1,3 = 0,590 \mu \text{ mole contre}$$

$0,510 \mu$ mole observées renouvelées en 5 minutes (tableau V-2 p.95)

Le même calcul donne pour 4094-B E10

$$\frac{5 \times 0,35^*}{15,3 + 5 \times 0,35^*} \times 15,3 = 1,6 \mu \text{ moles contre } 4 \mu \text{ moles}$$

réellement observées en 5 minutes (tableau V-2 p. 95).

Il faut admettre une surproduction plus importante que ne le suggère le chiffre de $0,35 \mu$ moles. Le calcul de la "productivité méthionine" de 4094-B.E10 à partir des résultats de l'expérience de renouvellement de la méthionine conduirait à :

$$\frac{5 \times X^*}{15,3 + 5 \cdot X^*} \times 15,3 = 4$$

soit $X = 1,10 \mu$ moles par minute et par gramme de cellules sèches.

C'est on le voit beaucoup plus important que le chiffre de $0,35$ obtenu par d'autres considérations.

Ceci nous amène en 2 heures - le temps d'une génération cellulaire - à une production totale de 132μ moles se répartissant en :

TABEAU V-3 - Activité spécifique de la méthionine synthétase dosée dans les extraits bruts de différentes souches résistantes après culture en milieu YNB

Les résultats obtenus avec les souches 4094-B et 199 M 1 figurent pour comparaison

Souches testées	Activité spécifique en n moles/min/mg protéine
4094-B	0,90 (4 exp.)
4094 B-S 4	1,15
4094 B-E 10	1
CC17-6A	1,05
199 M 1	1,2
199 M 1 - 102	1,5
CH 71 - 5A	0,9 - 1,15

- 26,5 μ moles dans les protéines
- 15 μ moles dans le cytoplasme sous forme de méthionine.
- 2 μ moles dans le cytoplasme sous forme de S.A.M.

Il reste 89 μ moles dont on perd la trace : un gaspillage de méthionine s'opérerait donc dans ces conditions. Ceci ne doit pas étonner outre mesure : le bilan des dosages de méthionine effectués après culture d'une souche sauvage en présence de méthionine dans le milieu de culture conduit à l'observation d'un déficit également important entre, d'une part, la somme des teneurs en méthionine de la masse cellulaire obtenue et du milieu usé et, d'autre part, de la quantité de méthionine ajoutée au milieu neuf non incubé. D'autre part, il faut également tenir compte de la méthionine excrétée dans le milieu de culture (7,5 μ moles par gramme pour cette souche - voir tableau IV-8 p. 83).

Il faut néanmoins remarquer que cette surproduction nécessite, pour être explicable, la dérégulation, chez les souches résistantes, de la synthèse d'au moins un ou plusieurs des enzymes impliqués dans la voie de biosynthèse. Or jusqu'à présent le dosage des enzymes du groupe 1 (homosérine transacétylase, A T P sulfurylase, sulfite réductase, homocystéine synthétase), après culture en milieu synthétique n'a jamais permis de montrer une différence quantitative entre les activités enzymatiques des souches résistantes et des souches sensibles (voir chapitre III). Des dosages effectués par M.C. Lhomond (1972) ont éliminé également la possibilité d'une dérégulation de la sulfate perméase et de l'A.P.S. kinase chez les mutants résistants. Les résultats du dosage de la méthionine synthétase dans les extraits bruts de différentes souches résistantes à l'éthionine (tableau V-3 p. 97) montrent également une absence de dérégulation du taux de synthèse de cet enzyme après culture dans les mêmes conditions. Il n'est pas exclu cependant, que la voie de biosynthèse des composés tétrahydrofoliques - aspect qui n'a pas encore été abordé dans notre laboratoire - soit un facteur limitant dans la biosynthèse globale de la méthionine : dans ce cas une dérégulation dans la synthèse d'un ou plusieurs des enzymes de cette voie permettrait d'expliquer une sur-

production de méthyl-tétrahydrofolates chez les mutants résistants avec, pour conséquence, une surproduction de méthionine. La nécessité d'une étude détaillée de cette partie de la chaîne de biosynthèse devient impérieuse. Cette investigation permettra peut-être d'apporter des éléments expliquant la réelle surproduction de méthionine chez les mutants résistants à l'éthionine.

V - 2.3 - Accumulation

Une difficulté dans l'utilisation de la méthionine aux fins de diverses réactions cellulaires permettrait également d'expliquer une teneur élevée chez les mutants résistants à l'éthionine (ce blocage ne devrait pas s'accompagner d'un taux de synthèse accru). Les deux principales voies d'utilisation de la méthionine sont :

1/ la transformation en méthionyl-t-RNA et l'utilisation de ce composé dans la synthèse protéique.

2/ la transformation en S.adénosyl-méthionine afin d'assurer les méthylations cellulaires.

Une synthèse difficile du méthionyl t-RNA pourrait impliquer d'une part, une modification du fonctionnement de la méthionyl t-RNA synthétase - (on a vu dans le chapitre III que la met. t-RNA synthétase des souches résistantes étudiées était normale), d'autre part, un ralentissement de la croissance de ces souches. Tel n'est pas le cas des souches étudiées en général.

Une déficience dans la transformation de la méthionine en S.adénosyl-méthionine, pourvu qu'elle ne soit pas absolue, pourrait être compatible avec une croissance normale et conduire à une accumulation de méthionine. L'étude des concentrations endocellulaires de S.adénosyl-méthionine chez diverses souches montre un niveau de S.adénosyl-méthionine endocellulaire anormalement bas chez les mutants résistants à teneur pourtant élevée en méthionine endocellulaire (tableau V-4 p. 100). La S.adénosyl-méthionine synthétase de ces

TABLEAU V-4 - Mesures des concentrations endocellulaires de méthionine et de S.adénosyl méthionine

après culture en milieu synthétique additionné ou non de méthionine

N.B. La méthionine est ajoutée à une concentration de 2 mM

Souches	4094-B	199 M 1-102 (eth 2.2)	4094 B.E 10 (eth 10.1)	4094-B-S4 (sem 4.1)
Addition au milieu de culture	- met	- met	- met	- met
Concentration endo- cellulaire en µmoles/g cellules sèches.				
Méthionine	1,5	15	14	14
S A M ⁽¹⁾	1,5	1,5	1,9	1
	6,8	1,5	1,9	0,95

(1) S A M = S.adénosyl méthionine.

(résultats obtenus en collaboration avec Y.S. Kerjan et
H. Cherst)

mutants, en présence de quantités élevées de méthionine devrait synthétiser davantage de S.adénosyl-méthionine. Une déficience en A T P cellulaire pourrait expliquer l'absence de synthèse supplémentaire de S.adénosyl-méthionine : une telle déficience entraînerait cependant une croissance ralentie ce qui n'est pas le cas des souches étudiées. Le même tableau montre, que si on augmente la concentration en méthionine endocellulaire chez ces souches par culture en présence de méthionine, le retentissement sur la fabrication de S.adénosyl-méthionine est nul alors qu'il est extrêmement net chez 4094-B.

On pourrait penser que la S.adénosyl-méthionine synthétase des mutants résistant à l'éthionine est modifiée et que son Km pour la méthionine est plus élevé que celui de l'enzyme présent chez la souche sensible. Mais, à moins de supposer un nombre important de sous-unités peptidiques constituant cet enzyme, il est exclu d'expliquer chaque mutation de résistance comme étant une mutation d'un gène codant une sous-unité de la S.adénosyl-méthionine synthétase d'autant que ces mutations sont indépendantes (chapitre III). D'autre part, une modification du Km ne conduirait pas à une teneur invariable en S.adénosyl-méthionine en présence de concentrations importantes en méthionine endocellulaire ; or les souches résistantes, bien que saturées en méthionine endocellulaire par culture en présence de méthionine exogène, ne fabriquent pas davantage de S. adénosyl-méthionine à l'exception de la souche portant la mutation "eth 3.1". Ce dernier argument rend peu probable l'hypothèse émise.

Une autre façon de concevoir le fonctionnement de la S.adénosyl-méthionine synthétase chez les mutants résistants serait de supposer qu'une des conséquences physiologiques de la régulation perturbée - donc commune à tous les mutants - serait un fonctionnement anormal in vivo de la S.adénosyl-méthionine synthétase des mutants résistants. Ceci pourrait encore renforcer l'élévation de la teneur endocellulaire en méthionine entraînée par la surproduction dans la voie de biosynthèse. Par ailleurs, Mertz et

Spence (1972) ont étudié une souche de Sacch.cerevisiae déficiente en S.adénosyl-méthionine synthétase : cette souche, résistant à l'éthionine, est sensible à la S.adénosyl-éthionine. Il semble donc que l'incapacité à transformer l'éthionine en S.adénosyl-éthionine soit une cause de résistance. Le fonctionnement de cet enzyme est donc impliqué d'une manière ou d'une autre dans les phénomènes observés chez les mutants résistant à l'éthionine. Il devient indispensable de l'étudier : on verra, dans le prochain chapitre, que le rôle de la S.adénosyl-méthionine dans la régulation fournit une raison supplémentaire d'étudier le fonctionnement de cette étape enzymatique.

CHAPITRE VI

ROLE DE LA S ADENOSYL METHIONINE DANS
LE MECANISME DE REGULATION

On a pu remarquer dans le chapitre précédent, la distorsion chez les souches résistant à l'éthionine, entre la concentration endocellulaire de S.adénosyl-méthionine, effectivement mesurée et celle que l'on était susceptible d'escompter du fait de leur teneur élevée en méthionine. En effet, dès que la teneur en méthionine libre endocellulaire s'élève chez la souche sauvage, par culture en milieu synthétique additionné de méthionine, la teneur endocellulaire en S.adénosyl-méthionine s'élève également (tableau V-4, p.100). Comme la teneur élevée en méthionine libre caractérise les souches résistant à l'éthionine cultivées en milieu synthétique, on s'attendait, sans qu'il soit besoin de recourir à des moyens identiques à ceux utilisés pour les souches sauvages (culture en présence de méthionine exogène) à ce que le niveau en S.adénosyl-méthionine endocellulaire soit élevé chez ces souches. Le tableau V-4, p.100 montre que tel n'est pas le cas. De plus, ce tableau montre que chez les souches résistant à l'éthionine cultivées en milieu synthétique additionné de méthionine, la teneur en S.adénosyl-méthionine reste basse bien que dans ces conditions, la concentration endocellulaire en méthionine soit très élevée.

Cette anomalie et la possibilité de disposer de S.adénosyl-méthionine nous ont conduit à étudier le rôle de ce métabolite.

VI - 1 - ETUDE DE LA SYNTHÈSE DE L'HOMOCYSTEINE SYNTHETASE ET DE L'A T P SULFURYLASE DE DIVERSES SOUCHES CULTIVÉES EN PRÉSENCE OU EN ABSENCE DE S.ADENOSYL-METHIONINE.

Les expériences relatées dans ce paragraphe VI-1 ont été effectuées en collaboration avec H. Cherest et Y. Kerjan.

VI - 1.1 - Souche 4094-B

La mesure des activités enzymatiques après culture de la souche 4094-B en milieu synthétique additionné ou non de S. adénosyl-méthionine a montré un effet "répresseur" de ce métabolite. Les pourcentages de répression du taux de synthèse des enzymes, mesurés après culture en présence de 0,15 mM de S.adénosyl-méthionine sont analogues à ceux observés après culture en présence de 2 mM de

méthionine (tableau VI-1, p.106).

Quelque soit le rôle de la S.adénosyl-méthionine, la mesure de la concentration endocellulaire en méthionine après culture en milieu synthétique additionné de S.adénosyl-méthionine (tableau VI-1, p.106), élimine la possibilité que la méthionine libre soit co-répresseur dans ces conditions. En effet, si, lors d'expériences en présence de méthionine exogène, on pouvait établir une corrélation entre la répression de la synthèse des enzymes biosynthétiques et la teneur endocellulaire en méthionine libre et admettre éventuellement le rôle co-répresseur de la méthionine libre, il devient évident après culture en présence de S.adénosyl-méthionine, que le mécanisme de répression intervient fort bien sans l'acide aminé libre. En effet, la teneur en méthionine libre endocellulaire est à peine plus élevée après culture en milieu synthétique additionné de S.adénosyl-méthionine qu'en milieu synthétique et pourtant la synthèse des enzymes est réprimée. La signification de la présence et l'origine de cette méthionine endocellulaire après culture en S.adénosyl-méthionine seront examinées dans le paragraphe VI-2.

VI - 1.2 - Souches 4094-B.S 4 - 199 M 1 . 102 - 4094-B.E 10

Ces trois souches résistant à l'éthionine, à teneurs très élevées en méthionine endocellulaire, se caractérisent également par leur faible teneur en S.adénosyl-méthionine (voir tableau V-4, p.100). Il est remarquable de constater que la synthèse des deux enzymes testés est bien réprimée après culture en milieu synthétique, additionné de S.adénosyl-méthionine (tableau VI-1, p.106). Dans ces expériences, on a mesuré la teneur endocellulaire en méthionine libre : elle est redevenue très voisine de celle de la souche sauvage cultivée en milieu synthétique minimum ou additionné de S.adénosyl-méthionine. Il est plausible de penser que la répression de la synthèse des deux enzymes étudiés s'étend à celle des autres enzymes répressibles de la voie de la méthionine, le résultat direct étant l'absence de synthèse de méthionine par le système biosynthétique propre à la cellule. Ce point méritait d'être confirmé par une étude de la synthèse endocellulaire de méthionine par les cellules de souches cultivées en milieu

TABLEAU VI-1 - 1.

Mesures des concentrations endocellulaires de méthionine (méthode microbiologique) et de S.adénosyl-méthionine (S A M) après culture en milieu synthétique additionné ou non de S.adénosyl-méthionine ou de méthionine.

2. Pourcentage de répression de l'homocystéine synthétase, et de l'A T P sulfurylase: ce pourcentage est calculé de la même manière et dans les mêmes conditions que celles indiquées dans le Tableau III-2, page 48.

(d'après H.Charest, Y.Kerjan et J. Antoniewski)

	Souche sensible 4094 B	Souches résistantes:			
		199 M1 102 (eth 2.2)	4094 B.E 10 (eth 10.1)	4094 B.S 4 (sem 4.1)	C J 21-11 B (3) (eth 3.1)
Addition au milieu de culture	- met. SAM	- met SAM	- met SAM	- met SAM	- met SAM
Concentration endocellulaire en µmoles/g cellules sèches					
Méthionine(1)	1,5 60 2,4	15 70 3	15 50 2,3	14 - 4	3,0 64 2,7
S A M (2)	1,5 6,8 36	1,5 1,5 21	1,9 1,9 47	1 0,95 -	7 22 23
Répression %					
Homocystéine synthétase	- 77 82	- 3 100	- 2 42	- 15 36	- 33 45,5
A T P sulfurylase	- 90 94	- 9 100	- 6 80	- 22 65	- 90 72

(1) Méthionine : addition de 2mM

(2) S A M : addition de 0,15 mM

(3) La souche CH 71-5A a été abandonnée, bien que portant la mutation eth 3.1, car Y. Kerjan a montré que cette souche était déficiente en S A M perméase

synthétique additionné de S.adénosyl-méthionine.

VI - 2 - ETUDE DE LA BIOSYNTHESE ENDOCELLULAIRE DE METHIONINE CHEZ
DIFFERENTES SOUCHES CULTIVÉES EN PRESENCE DE S.ADENOSYL-
METHIONINE.

On a vu tout l'intérêt des cultures radioactives en sulfate ^{35}S pour marquer la méthionine biosynthétisée de façon endocellulaire (chapitre II et IV). Il était intéressant d'appliquer cette technique à l'étude de l'action de la S.adénosyl-méthionine. Des cultures de 4094-B et de 4094-B.E 10, de 199 M1 et de 199 M1-102 en milieu synthétique (dont le sulfate était radioactif) additionné ou non de S.adénosyl-méthionine à raison de 0,15 mM ont permis, par les techniques décrites, de mesurer la méthionine endocellulaire fabriquée dans les différentes conditions.

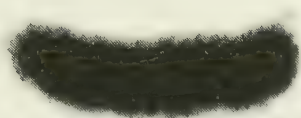
Les souches cultivées pendant cinq à six générations cellulaires en milieu synthétique radioactif (^{35}S) sans S.adénosyl-méthionine, possèdent des teneurs en méthionine radioactive prévues par les dosages faits à l'aide de la méthode microbiologique (chapitre IV et tableau VI-2, p.108). On vérifie la teneur élevée en méthionine des souches 199 M1-102 et 4094 B.E 10, comparée à celle des souches isogéniques dont elles dérivent 199 M1 et 4094-B.

Les cultures en milieu synthétique radioactif ^{35}S additionnées de S.adénosyl-méthionine conduisent à des mesures de méthionine radioactive négligeables après cinq à six générations cellulaires. Le système de répression a bien fonctionné et il n'y a pas eu de méthionine biosynthétisée par le système endocellulaire : ceci confirme le rôle actif joué par la S.adénosyl-méthionine dans la répression (tableau VI-2, p.108 , et photographie VI-1 et 2, p.109 et 110). On remarque également l'absence de sulfate ou plus exactement de soufre radioactif sous toute forme dans les extraits bouillis de ces cellules. L'entrée du soufre est donc bloquée par la présence de la S.adénosyl-méthionine : ceci suggère que la sulfate perméase subit la même régulation que les enzymes testés ci-dessus. L'étude des hydrolysats protéiques cellulaires dans les mêmes expériences vient encore confirmer

TABEAU VI-2 - Etude de la méthionine endocellulaire biosynthétisée par la cellule cultivée en présence ou absence de S.adénosyl-méthionine (S A M)

Les résultats sont exprimés en μ moles/g cellules sèches.

Souche	Condition de milieu	Concentration endocellulaire en méthionine mesurée par méthode microbiologique	Concentration endocellulaire mesurée par méthode radioactive	Concentration en méthionine engagée dans les protéines cellulaires	Concentration cellulaire en S.radio actif libre
4094-B	Synthétique	1,5	1,3	26,5	17,8
	Synthétique +SAM 0,15 mM	-	0,020	-	0,53
4094 B.E 10	Synthétique	15	15,3	-	-
	Synthétique +SAM 0,15 mM	-	0,060	-	-
199 M 1	Synthétique	0,5	0,3	-	32
	Synthétique +SAM 0,15 mM	-	0	-	0,91
199 M1-102	Synthétique	15	8,6	-	29,2
	Synthétique +SAM 0,15 mM	-	0	-	1,48



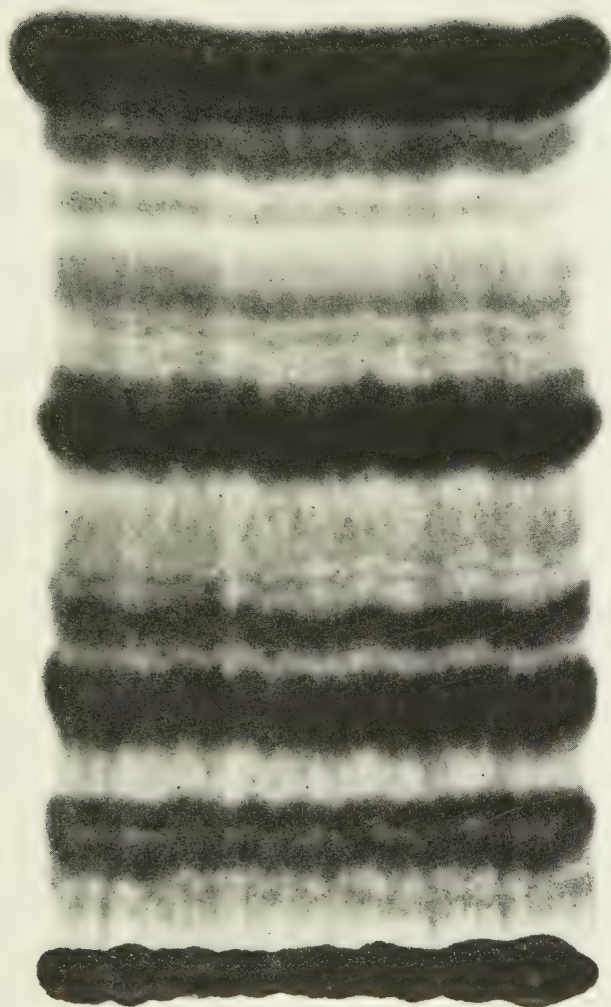
Culture en milieu
synthétique + ^{35}S
 $20\mu\text{l}$

Méthionine

Culture en milieu syn-
thétique + ^{35}S + SAM
 $100\mu\text{l}$

Souche 4094-B

Photographie VI-1



Culture en milieu synthétique
+ ^{35}S
100 μl

Méthionine

Culture en milieu syn-
thétique + ^{35}S + SAM
100 μl

Souche 4094 B -E 10

Photographie VI-2

ces résultats (tableau VI-2, p.108) et permet d'obtenir le chiffre de méthionine liée aux protéines utilisé dans les chapitres II et V. D'où vient alors la méthionine présente dans les cellules après culture en présence de S.adénosyl-méthionine ? La répression de synthèse des enzymes fonctionnant aussi parfaitement (absence quasi totale de méthionine radioactive), il ne pourrait y avoir croissance cellulaire si la méthionine était totalement absente de la cellule. Or il y a croissance et présence de méthionine endocellulaire libre qui est donc non radioactive. (mesures microbiologiques du tableau VI-1, p.106). On sait que la S.adénosyl-méthionine endocellulaire participe à un cycle enzymatique qui permet de régénérer la méthionine. Il était donc raisonnable de penser que la méthionine dosée par la méthode microbiologique provenait de ce cycle. L'utilisation de cultures en milieu synthétique additionné de S.adénosyl-méthionine radioactive (^3H), a permis de vérifier dans ces conditions que la méthionine extraite était radioactive, et provenait donc bien de la S.adénosyl-méthionine.

Par ailleurs, l'évolution de la teneur endocellulaire en méthionine radioactive après addition de S.adénosyl-méthionine au milieu de culture (expériences analogues à celles décrites dans le chapitre II-1) est semblable à l'évolution théorique prévue pour l'action de la méthionine (fig. VI-1, p.112).

VI - 3 - CAS PARTICULIER DES SOUCHES PORTANT LA MUTATION DE RESISTANCE "eth 3-1".

On a pu remarquer dans le tableau VI-1, p. 106 que la souche CJ 21.11 B ne se comportait pas comme les autres souches résistantes. En effet, l'addition de méthionine au milieu de culture augmente la concentration endocellulaire en S.adénosyl-méthionine : celle-ci était déjà importante en milieu synthétique. Il semble que la difficulté à transformer la méthionine en S.adénosyl-méthionine qui caractérise les souches résistantes à teneurs élevées en méthionine endocellulaire n'existe pas chez la souche qui porte le gène de résistance eth 3-1 et, qu'en contre-partie, l'élévation de la teneur en méthionine soit peu accusée chez cette souche. Si la S.adénosyl-méthionine était le

FIGURE VI-1 :

Evolution, après addition au milieu de culture de 0,15 mM de S.adénosyl-méthionine, de la teneur endocellulaire en méthionine marquée dans le 35 S chez la souche 4094-B cultivée en milieu synthétique minimum.

LEGENDE

En abscisses : Temps en heures. Le temps 0 coïncide avec l'addition de la S.adénosyl-méthionine au milieu de culture.

En ordonnées logarithmiques : Teneur en méthionine radioactive exprimée en μ moles par gramme de cellules sèches.

La droite tracée est celle obtenue par le calcul théorique basé sur une teneur initiale de $1,24 \mu$ moles de méthionine par gramme de cellules sèches et sur un temps de division cellulaire de 2 h 15 minutes (voir chapitre II - Figure II-1).

On a reporté les résultats obtenus avec la méthionine (x) (reportés de la figure II-1) ; les résultats obtenus avec la S.adénosyl-méthionine sont matérialisés par des (.).



Figure VI 1

co-répresseur, il serait possible de considérer la mutation eth 3-1 comme une mutation d'apo-répresseur. Toutefois, cette hypothèse ne peut être retenue telle quelle puisque la S.adénosyl-méthionine exogène 0,15 mM réprime au moins partiellement la synthèse des enzymes (H. Cherest, communication personnelle). On peut quand même se demander si une diminution d'affinité d'un apo-répresseur hypothétique pour la S.adénosyl-méthionine (analogue à celle postulée pour la mutation eth 2-1) ne pourrait pas expliquer l'absence de répression observée malgré la présence d'une teneur élevée en S.adénosyl-méthionine endocellulaire.

VI - 4 - CONCLUSION.

Les cultures de diverses souches en présence de S.adénosyl-méthionine conduisent à admettre un rôle important de ce métabolite dans la répression de la synthèse des enzymes de la voie de la méthionine : en effet

- : 1) Les activités enzymatiques mesurées montrent que la synthèse de deux, au moins, des enzymes est réprimée (A T P sulfurylase et homocystéine synthétase).
- : 2) La mesure de la biosynthèse de la méthionine montre que le système biosynthétique de la cellule ne fonctionne pas et que la synthèse de la sulfate perméase est très probablement réprimée.

Par ailleurs, le comportement de la souche portant la mutation eth 3-1 peut, éventuellement, permettre d'avancer l'hypothèse d'une modification chez cette souche d'un éventuel apo-répresseur, sensible à la S.adénosyl-méthionine.

DISCUSSION - CONCLUSION

Les résultats que nous venons d'exposer, concernant la régulation de la voie de biosynthèse de la méthionine et les aspects physiologiques de cette régulation, permettent d'énoncer les conclusions suivantes :

1) La régulation de cette voie de biosynthèse se fait par le mécanisme de répression, contrairement à ce qu'on observe chez E. coli où il y a régulation par rétroinhibition et par répression ;

2) Les mutants de régulation, obtenus par résistance à l'éthionine ou à la sélénométhionine, se caractérisent par une absence ou une diminution de répressibilité des enzymes étudiés - ATP sulfurylase, homocystéine synthétase et sulfite réductase -. Ces mutants n'apparaissent pas "déréprimés" par rapport au type sauvage quand on compare les activités enzymatiques dosées dans les extraits bruts de cellules provenant de cultures en milieu synthétique ;

3) Les mutants de régulation se caractérisent également par une augmentation très nette de la teneur endocellulaire en méthionine libre : cette augmentation est vraisemblablement due à une surproduction dans la chaîne de biosynthèse encore qu'aucun des enzymes dosés ne soit déréprimé dans son taux de synthèse après culture en milieu minimum ;

4) La transformation de la méthionine en S-adosylméthionine ne paraît pas se faire dans des conditions analogues chez les mutants de régulation et les souches sauvages : nous ignorons si nous nous trouvons en présence d'une déficience génétique de la S-adosylméthionine synthétase ou d'un mécanisme physiologique entraînant chez les mutants résistant à l'éthionine, un blocage de la réaction par inhibition ;

5) L'action de la S-adosylméthionine dans la régulation des souches sauvages ou résistantes à l'éthionine permet d'avancer l'hypothèse du rôle actif de ce métabolite dans la régulation : nos conclusions dans ce domaine rejoignent les hypothèses émises par Greene et coll. dans l'étude de E. coli et celles de Smith et coll. dans l'étude de S. typhimurium.

Nous avons réuni, dans un tableau récapitulatif, page 117, les principales caractéristiques provenant de l'étude comparée de 4094B, souche sensible à l'éthionine, et de 4094B.E10, souche isogénique correspondante très résistante à l'éthionine. L'examen des résultats, obtenus pour ces deux souches, permet, en effet, de saisir l'essentiel de ce qui a été présenté et appelle les remarques suivantes :

1) La première concerne le phénotype dérèprimé des mutants décrits : si les niveaux enzymatiques observés chez les souches sauvages et résistantes sont du même ordre après culture en milieu synthétique, il faut néanmoins remarquer que les concentrations endocellulaires de méthionine sont très différentes. Il faudrait donc plutôt comparer les niveaux enzymatiques de la souche sauvage cultivée dans des conditions où la concentration endogène est similaire à celle que l'on observe chez les mutants après culture en milieu synthétique. Quand ces conditions sont réalisées, l'expérience montre que des niveaux enzymatiques réprimés sont présents chez la souche sauvage et que dès lors, les mutants de régulation peuvent apparaître comme dérèprimés. Une ambiguïté demeure cependant : il est difficile de comprendre pourquoi en milieu synthétique minimum, les souches sauvages ne produisent pas autant de méthionine que les souches résistantes puisqu'elles ont des niveaux enzymatiques analogues. D'autre part, la possibilité de dérèprimer la synthèse des enzymes en chemostats limités en méthionine chez des souches sauvages et chez des mutants de régulation, incline à penser qu'ils ne sont normalement pas dérèprimés : en effet, une souche auxotrophe pour la méthionine et portant par ailleurs une mutation entraînant la résistance à l'éthionine (eth 2-2), possède des niveaux enzymatiques, après culture en milieu synthétique additionné de faibles quantités de méthionine (0,2 mM), comparables à ceux observés chez une souche sauvage. Dans ce cas, la concentration endocellulaire faible résultant de culture en présence d'une concentration exogène faible en méthionine, permet de comparer les niveaux enzymatiques obtenus dans les mêmes conditions.

2) Nous avons insisté dans le chapitre V sur les problèmes posés

Tableau Récapitulatif

Conditions de culture	Milieu synthétique minimum	Milieu synthétique minimum + 2mM DL méthionine	Milieu synthétique minimum + 0,15 mM SAM
Souches	4094B 4094B.E10	4094B 4094B.E10	4094B 4094B.F10
Homocystéine synthétase			
Activités (1)	340 350	80 342	61 201
Enzymatiques			
ATP	148 153	15 143	9 30
sulfurylase			
Teneur endocellulaire en méthionine en μ moles/g cellules sèches	1,5 15	60 50	2,4 2,3
Teneur endocellulaire en S.adenosyl méthionine en μ moles/g cellules sèches	1,5 1,9	6,8 1,9	36 47

(1) Les activités spécifiques sont exprimées en n.moles de substrat transformé par mg de protéine et par minute.

par la surproduction de méthionine chez les mutants de régulation ; nous rappellerons ici qu'il est toujours possible d'imaginer qu'un ou plusieurs enzymes intervenant dans la voie de synthèse des tétrahydrofolates pourraient être dérégulés et assurer la surproduction ; c'est une hypothèse qu'il conviendra de vérifier ultérieurement.

3) Le fonctionnement anormal de la S-adénosylméthionine synthétase chez les mutants de régulation rend souhaitable une étude précise de cet enzyme et de son fonctionnement : nous rejoignons, dans ce domaine, les conclusions de Smith citées dans l'introduction.

Y. Surdin-Kerjan et H. Cherest ont confirmé la corrélation existant entre la charge du tRNA^{met} et la dérégulation des enzymes intervenant dans la biosynthèse de la méthionine : les résultats de l'étude en chemostat des cultures de souches auxotrophes pour la méthionine sont les mêmes que ceux obtenus par l'étude d'une souche méthionyl-tRNA synthétase déficiente. L'hypothèse de l'intervention du méthionyl-tRNA dans la régulation en tant que co-répresseur est donc toujours avancée : cette hypothèse a le mérite de fournir une explication générale des mécanismes de régulation de la synthèse des acides aminés puisque ceux-ci subissent toujours, au sein de la cellule, la transformation en amino-acyl-tRNA. On sait par ailleurs que ces amino-acyl-tRNA subissent, en vue de leur fonctionnement, des modifications précises. Certaines de ces modifications consistent en des méthylations sur certaines positions des bases puriques et pyrimidiques et sur les riboses des différents nucléosides (voir le cas "Histidine" chez *S. typhimurium* présenté dans l'introduction). Or, l'agent des méthylations cellulaires est toujours la S-adénosylméthionine. Les résultats que nous avons exposés ici, sur le rôle de la S-adénosylméthionine, ne sont pas forcément en contradiction avec l'hypothèse d'un rôle actif du méthionyl-tRNA. Il nous paraît plausible de suggérer que S-adénosylméthionine et méthionyl-tRNA sont impliqués ensemble dans la régulation : la S-adénosylméthionine par son rôle modificateur des tRNA permettrait l'édification de la structure correcte du tRNA^{met} et son rôle de co-répresseur.

Nous voudrions ici ouvrir une parenthèse critique sur le travail effectué sur les concentrations endocellulaires de méthionine. La mesure du K_m pour la méthionine de la méthionyl-tRNA synthétase de souches activant normalement cet acide aminé, aboutit à des valeurs de $0,2 \mu M$ (Y. Kerjan - communication personnelle). On observe chez une souche telle que D₆, auxotrophe pour la méthionine, une concentration endocellulaire en méthionine de $0,8 \mu$ mole par gramme de cellules sèches (voir chapitre III), après culture en conditions non réprimantes. Cette concentration correspond à une molarité de $0,2 \text{ mM}$ (voir Matériel et Méthodes) : dans ces conditions, Y. Kerjan et coll. ont montré que le tRNA^{met} était chargé à 100 %. Ces auteurs ont constaté que chez la même souche cultivée en chemostat limité en méthionine, le tRNA^{met} n'était chargé qu'à 50 %, alors que la teneur endocellulaire en méthionine était de $0,1 \text{ mM}$. Tout ce passe donc comme si la met-tRNA synthétase était saturée in vivo en présence de $0,2 \text{ mM}$ de méthionine et à demi-saturation en présence de $0,1 \text{ mM}$ de méthionine. Cette dernière concentration est bien plus élevée que la valeur du K_m mesurée in vitro et on pourrait légitimement s'attendre à ce que l'activité de l'enzyme conduise dans tous les cas à une charge totale du tRNA^{met} . On peut admettre, qu'in vivo, l'enzyme n'est pas dans des conditions optimales de fonctionnement et que l'activité mesurée in vitro est surestimée. Mais on peut également suggérer que toute la méthionine endocellulaire n'est pas uniformément répartie : il se pourrait qu'une compartimentation au sein de la cellule ait pour résultat, au niveau de l'enzyme d'activation, une concentration très faible qui serait de l'ordre de grandeur du K_m mesuré in vitro. Il est certain que nos mesures de concentrations endocellulaires de méthionine ont été réalisées en ignorant cet aspect qui pourrait être physiologiquement important.

Enfin, pour revenir aux problèmes de régulation, les études de Lavallé (1970), ont permis d'étayer l'hypothèse d'un contrôle de la régulation de la synthèse du tryptophane chez E. coli à la fois au niveau transcription et au niveau traduction. Il serait possible - encore que ce ne soient que spéculations - d'imaginer dans notre cas un rôle du méthionyl-tRNA et un rôle de la S-adenosylméthionine chacun

agissant à deux niveaux différents. Cette hypothèse n'exclut d'ailleurs pas les relations spécifiques exposées dans le schéma précédent entre la S.adénosyl-méthionine et le méthionyl-tRNA, et elle pourrait rendre compte des diverses modifications de régulations rencontrées chez les divers mutants.

Quelle que soit l'explication définitive émise au niveau fondamental, l'objectif d'applications à des cultures industrielles que nous nous étions fixés au départ, trouve dans certains de nos résultats une concrétisation possible. La majorité des processus de fabrication biologique des acides aminés (acide glutamique - lysine), en quantité industrielle repose sur l'utilisation des corynébactéries. La transformation de l'anthranilate en tryptophane par des souches de levures a pu être réalisée grâce à l'obtention de souches résistant à l'effet inhibiteur de l'anthranilate. Tous ces procédés reposent sur une excrétion dans le milieu de culture du produit synthétisé. Les résultats que nous avons obtenus montrent la possibilité d'améliorer le contenu cytoplasmique de la levure en un acide aminé donné. Il est certain que la méthionine n'est pas intéressante sur le plan industriel puisqu'elle est synthétisée chimiquement dans les meilleures conditions de rentabilité. Néanmoins, les résultats obtenus suggèrent la possibilité d'utiliser les mêmes techniques pour obtenir des souches de levure à concentration endocellulaire élevée en un acide aminé essentiel (lysine, par exemple). Il reste cependant à éclairer le problème technologique suivant :

Si les protéines de levures sont extraites - en vue d'éliminer les accidents de digestibilité dus aux parois cellulaires - qu'en sera-t-il des acides aminés libres : faudra-t-il les récupérer par ailleurs et cette récupération sera-t-elle rentable ?

Cette question devrait être préalablement résolue avant que l'industriel soucieux d'améliorer la qualité alimentaire des levures nutritives, ne s'engage dans un tel programme de sélection.

BIBLIOGRAPHIE

Black, S. et Wright, N.G. : 1955.

Aspartic -semialdehyde dehydrogenase and aspartic -semialdehyde. J. Biol. Chem. 213, p. 39.

Botsford, J.L. et Parks, L.W. : 1967.

Role of S-adenosyl methionine in methionine biosynthesis in yeast. J. of Bacteriol. 94, p. 966.

Brenner, M. et Ames, B.N. : 1972.

Histidine regulation in Salmonella typhimurium : IX Histidine transfer ribonucleic acid of the regulatory mutants. J. Biol. Chem. 247, p. 1080.

Chang, G.W., Roth, J.R. et Ames, B.N. : 1971.

Histidine regulation in S. typhimurium : VIII Mutations of the hisT gene. J. of Bact. 108, p. 410.

Cherest, H. et de Robichon-Szulmajster, H. : 1966.

Résistance à l'éthionine chez Sacch.cerevisiae. I. Etude génétique. Genetics 54, p. 981.

Cherest, H. et de Robichon-Szulmajster, H. : 1966.

Résistance à l'éthionine chez Sacch.cerevisiae. II. Etude physiologique. Genetics 54, p. 993.

Cherest, H., Talbot, G. et de Robichon-Szulmajster, H. : 1970.

The role of homocysteine synthetase in an alternate route for methionine biosynthesis in Sacch.cerevisiae. J. of Bact. 102, p. 448.

Cherest, H. : 1970.

Thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Orsay n° A.O.4143. Biosynthèse de la méthionine et sa régulation chez Sacch.cerevisiae.

Cherest, H., Surdin-Kerjan, Y. et de Robichon-Szulmajster, H. : 1971.

Methionine-mediated repression in Sacch.cerevisiae : a pleiotropic regulatory system involving methionyl transfer ribonucleic acid and the product of gene eth2. J. of Bact. 106, p. 758.

Fankhauser, D.B., Ely, B. et Hartman, P.E. : 1971.

The Salmonella histidine promotor-operator. Genetics 68, suppl. S. 18.

Fink, G.R. et Roth, J.R. : 1968.

Histidine regulatory mutants in S. typhimurium. VI dominance studies. J. Mol. Biol. 33, p. 547.

Fiske, C.H. et Subbarow, Y. : 1925.

The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, p. 375.

Galzy, P. et Slonimski, P.P. : 1957.

Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur acide lactique comme seule source de carbone. Compt. Rend. Acad. Sci. 245, p. 2556.

Greene, R.G., Su, C.H. et Holloway, C.T. : 1970.

S-adenosyl methionine synthetase deficient mutants of E. coli K12 with impaired control of methionine biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Comm. 38, p. 1120.

Grenson, M., Mousset, M., Wiame, J.M. et Bechet, J. : 1966.

Multiplicity of the amino acid permeases in Sacch.cerevisiae. I Evidence for a specific arginine transporting system. Biochim. Biophys. Acta. 127, p. 325 et 339.

Grenson, M., Mousset, M., Wiame, J.M. et Bechet, J. : 1967.

Multiplicity of the amino acid permeases in Sacch.cerevisiae. II Evidence for a specific methionine transporting system. Biochim. Biophys. Acta. 135, p. 507.

Gross, T.S., Rowbury, R.J. : 1969.

Methionyl transfer RNA synthetase mutants of S. typhimurium which have normal control of the methionine biosynthetic enzymes. Biochim. Biophys. Acta. 184, p. 233.

Gross, T.S., Rowbury, R.J., Chater, K.F. et Lawrence, D.A. : 1970.

Suppression of methionyl transfer RNA synthetase mutants of S. typhimurium by methionine regulatory mutations. J. Gen. Microbiol. 63, p. 121.

Hartman, P.E., Hartman, Z. et Serman, D. : 1960.

Complementation mapping by abortive transduction of histidine requiring Salmonella mutants. J. Gen. Microbiol. 22, p. 354.

Hartman, P.E., Loper, J.C. et Serman, D. : 1960.

Fine structure mapping by complete transduction between histidine-requiring Salmonella mutants. J. Gen. Microbiol. 22, p. 323.

Hayes, D.H. et Beaud, G. : 1971.

Propriétés des ribosomes et du RNA synthétisés par E. coli cultivé en présence d'éthionine. I. Interactions entre les sous-unités ribosomiques 30 S et 50 S synthétisées en présence d'éthionine. Eur. J. Biochem. 19, p. 323.

Johnston, J.R. et Mortimer, R.K. : 1959.

Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. J. of Bact. 78, p. 292.

Kredich, N.M. et Tomkins, G.N. : 1966.

The enzyme synthesis of L-cysteine in E. coli and S. typhimurium. J. Biol. Chem. 241, p. 4955.

Lavallé, R. et de Hauwer, G. : 1970.

Tryptophan messenger translation in E. coli. J. Mol. Biol. 51, p. 435.

Lhomond, M.C. : 1972.

Diplôme d'Etudes Approfondies. Faculté d'Orsay : Adenylyl sulfate kinase et sulfate permease chez Sacch.cerevisiae : activité et régulation.

Lewis, J.A. et Ames, B.N. : 1972.

Histidine regulation in S.typhimurium. XI. The percentage of transfer RNA^{his} charged in vivo and its relation to the repression of the histidine operon. J. Mol. Biol. 66, p. 131.

Masselot, M. et de Robichon-Szulmajster, H. : 1972.

Nonsense mutation in the regulatory gene ETH2 involved in methionine biosynthesis in Sacch.cerevisiae. Genetics 71, p. 535.

Mertz, J.E. et Spence, K.D. : 1972.

Methionine adenosyltransferase and éthionine resistance in Sacch.cerevisiae. Genetics 71, p. 535.

Monod, J. : 1950.

La technique de culture continue : théorie et applications. A nn. Inst. Pasteur 78, p. 390.

Mosteller, R.D. et Yanofsky, C. : 1970.

Evidence that tryptophanyl transfer ribonucleic acid is not the co-repressor of the tryptophan operon of E. coli. J. of Bact. 105, p. 268.

Nazario, M., Kinsey, J.A. et Ahmad, M. : 1971.

Neurospora mutant deficient in tryptophanyl-transfer ribonucleic acid synthetase activity. J. of Bact. 105, p. 121.

Neidhart, F.C. : 1965.

Role of valyl-sRNA synthetase in enzyme repression. Proc. Natl. Acad. Sci. US 53, p. 539.

Neidhart, F.C. : 1966.

Roles of amino-acid activating enzymes in cellular physiology. Bact. Rev. 30, p. 701.

Novick, A. et Szilard, L. : 1949

Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. US 36, p. 708.

Roth, J.R. et Ames, B.N. : 1966.

Histidine regulatory mutants in S. typhimurium. II. Histidine regulatory mutants having altered histidyl-tRNA synthetase. J. Mol. Biol. 22, p. 325.

Sakami, W. et Toennies, G. : 1942.

The investigation of amino acid reactions by methods of non-aqueous titrimetry. II. Differential acylation of hydroxy-groups and a method for the preparation of the acetyl derivatives of hydroxy-amino acids. J. Biol. Chem. 144, p. 203.

Savin, M.A., Flavin, M. et Slaughter, C. : 1972.

Regulation of homocysteine biosynthesis in S. typhimurium. J. of Bact. 111, p. 547.

Schlessinger, S. et Magasanik, B. : 1964.

Effect of α -methyl histidine on the control of histidine synthesis. J. Mol. Biol. 9, p. 670.

Shapiro, S.D. et Ehninger, D.J. : 1966.

Methods for the analysis and preparation of Adenosyl-methionine and adenosylhomocysteine. Ann. Biochem. 15, p. 323.

Silbert, D.F., Fink, G.R. et Ames, B.N. : 1966.

Histidine regulatory mutants in S. typhimurium : II. A class of regulatory mutants deficient in tRNA for histidine. J. Mol. Biol. 22, p. 335.

Smith, D.A. : 1971.

S-amino acid metabolism and its regulation in E. coli and S. typhimurium. Adv. in Genetics 16, p. 141.

Stadtman, E.R., Cohen, G.N., Le Bras, G. et de Robichon-Szulmajster : 1961.

Feed-Back inhibition and repression of aspartokinase activity in E. coli and Sacch.cerevisiae. J. Biol. Chem. 236, p. 2033.

Steele, B.F., Sauberlich, H.E., Reynolds, M.S. et Baumann, C.A. : 1948.

Media for Leuconostoc mesenteroides P 60 and Leuconostoc citrovorum. 8081. J. of Bact. 30, p. 533.

Stickland, L.H. : 1951.

The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. J. Gen. Microbiol. 5, p. 698.

Surdin, Y., Sly, W., Bordes, A.M. et de Robichon-Szulmajster, H. : 1965.

Propriétés et contrôle génétique du système d'accumulation des acides aminés chez Sacch.cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta, 107, p. 546.

Surdin-Kerjan, Y. : 1967.

La semi-aldehyde aspartique deshydrogenase chez Sacch.cerevisiae : propriétés et régulation. Eur. J. Biochem. 2, p. 341.

Surdin, Y., de Robichon-Szulmajster, H., Lachowicz, T.M. et Slonimski, P.P. : 1969.

Déficiencie en cytochrome oxydase chez les souches de Sacch.cerevisiae exigeant la thréonine pour la croissance. I. Relations génétiques. Eur. J. Biochem. 7, p. 526.

Surdin, Y., de Robichon-Szulmajster, H. et Slonimski, P.P. : 1969.

Déficiencie en cytochrome oxydase chez les souches de Sacch.cerevisiae exigeant la thréonine pour la croissance. II. Relations métaboliques. Eur. J. Biochem. 7, p. 531.

de Vito, P.C. et Dreyfus, J. : 1964.

Metabolic regulation of adenosine triphosphate sulfurylase in yeast. J. of Bact. 88, p. 1341.

Wiame, J.M., Bechet, J. et Grenson, M. : 1970.

Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in Sacch.cerevisiae. Eur. J. Biochem. 12, p. 31.

Wiame, J.M., Ramos, F., Thuriaux, P. et Bechet, J. : 1970.

The participation of ornithine and citrulline in the regulation of arginine metabolism in Sacch.cerevisiae. Eur. J. Biochem. 12, p. 40.

Wiame, J.M. : 1972.

The regulation of arginine metabolism in Sacch.cerevisiae. Current topics in cellular regulation. Vol. IV, p. 2.

Wickerham : 1946.

Journal of Bacteriology, 52, p. 293.

Wiebers, J.L. et Garner, H.R. : 1967.

Homocysteine and cysteine synthetases of Neurospora crassa. J.
Biol. Chem. 242, p. 12.

Wilson, L.G. et Bandurski, R.S. : 1958.

Enzymatic reactions involving sulfate, selenate and molybdate.
J. Biol. Chem. 233, p. 975.

Wright, N.G. : 1955.

Homoserine dehydrogenase. J. Biol. Chem. 213, p. 51.

CHAPITRE ANNEXE

DEFICIENCE EN CYTOCHROME OXYDASE CHEZ DES SOUCHES DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE EXIGEANT LA THREONINE POUR LA
CROISSANCE - ASPECTS PHYSIOLOGIQUES

Cette étude a été réalisée en collaboration avec
Y. SURDIN-KERJAN

INTRODUCTION

La synthèse du système respiratoire chez Sacch. cerevisiae est sujette à une forte répression catabolique s'exerçant avec une intensité variée sur les divers enzymes qui composent ce système. Bien que tous ces enzymes soient fonctionnellement mitochondriaux, leurs déterminants génétiques peuvent être nucléaires (c'est le cas du cytochrome c^{1,2}) ou au moins en partie mitochondriaux (c'est le cas de la cytochrome oxydase^{2,3} - cytochrome c : O₂ oxidoreductase, E.C.1.9.3.1). Même si le déterminisme des autres enzymes de la chaîne respiratoire reste encore controversé, de nombreuses observations provenant d'approches très diverses font couramment ressortir une gradation dans le taux de synthèse de ces enzymes soit sous l'effet de mutations d'élément(s) à hérédité mitochondriale^{3,4} soit par modifications des conditions physiologiques (concentration en glucose, présence d'inhibiteurs, etc.^{4,5,6}) la cytochrome oxydase étant toujours l'enzyme dont la synthèse est la plus affectée.

Les conditions physiologiques permettant la dérépression de la synthèse de la cytochrome oxydase chez des souches génétiquement "grandes" ont été bien définies³. Cependant, on observe souvent qu'elles ne s'appli-

quent que partiellement à de nombreuses souches de Sacch.cerevisiae, utilisées pour des expériences génétiques, et portant par conséquent des déficiences métaboliques variées. Cette situation présente divers inconvénients dont le moindre n'est pas la difficulté, et même dans certains cas l'incapacité de faire sporuler certains diploïdes (rappelons que la sporulation chez Sacch.cerevisiae requiert un métabolisme aérobie intact^{3,7}). Il semblait donc nécessaire d'entreprendre un effort de clarification des causes physiologiques et (ou) génétiques de ces déficiences respiratoires fonctionnelles.

Au cours d'une étude précédente concernant des souches portant des mutations dans la voie de biosynthèse de la thréonine, des conditions de culture permettant ou excluant la synthèse de la cytochrome oxydase (auxotrophie différentielle) avaient pu être définies^{8,9}. Depuis, cette étude a été étendue à d'autres caractères d'auxotrophies et à d'autres enzymes respiratoires afin de déterminer la spécificité éventuelle des phénomènes observés. Les résultats présentés ci-dessous démontrent que l'incapacité des mutants auxotrophes pour la thréonine à lever la répression catabolique exercée par le glucose résulte d'un phénomène plus général. Pour chaque combinaison d'exigences métaboliques étudiée, un équilibre peut être trouvé entre la concentration en glucose, source d'énergie et répresseur catabolique, et les concentrations relatives des différents facteurs d'auxotrophie permettant ainsi une synthèse dérégulée de l'ensemble des enzymes respiratoires. La cytochrome oxydase reste, dans chaque cas, l'enzyme dont la synthèse est la plus facilement perturbée et la plus difficilement rétablie.

MATERIEL ET METHODES

Souches

Au cours de ce travail, nous avons utilisé les souches de Sacch.cerevisiae suivantes : JE2 ($\underline{\alpha}$,ade₂,hom₆^{*}) provenant de la collection de R.K. Mortimer ; 4094-B ($\underline{\alpha}$,ade₂,ura₁) et D240-1B ($\underline{a}$,lys₂) provenant de la collection de F. Sherman ; 113-2A ($\underline{a}$,ade₂,ura₁,hom₃^{*}) provenant de la collection de M. Luzzati ; CC60-13A ($\underline{\alpha}$,ura₁,hom₂,hom₃) ; CH104-3 ($\underline{a}$,asp₅^{*}) ; 19-11 ($\underline{\alpha}$,hom₂,ura₁) ; 23-3 ($\underline{a}$,hom₂) ; T1-6 ($\underline{a}$,ade₂,ura₁,thr₁) ; T4-8 ($\underline{a}$,ade₂,thr₄) et YS5 ($\underline{\alpha}$,ade₂) provenant de ce laboratoire. 19-11R3 et 23-3R4 sont des mutants réverses spontanés (homosérine prototrophes) des mutants 19-11 et 23-3.

Milieux de culture

Les milieux utilisés sont des milieux YPA contenant pour 1 l. : extrait de levure Difco : 5g ; peptone Difco : 5g ; adénine : 20mg. Sauf indication contraire, le glucose est ajouté à raison de 30g/l (milieu YPGA) et l'éthanol de 20g/l (milieu YPEA).

Conditions de culture

Les précultures sont effectuées dans le même milieu que la culture correspondante. Les cultures sont ensemencées à partir des précultures à une densité cellulaire comprise entre 2×10^5 et 1×10^6 cellules par

* Pour nous conformer à la nouvelle nomenclature nous avons appelé hom₂,hom₃,hom₆ et asp₅, les gènes respectivement notés thr₂,thr₃,thr₆ et thr₅ dans l'ancienne nomenclature¹⁰.

millilitre. Les cultures sont réalisées en aérobiose à 28°C, et, sauf indication contraire, maintenues jusqu'à l'établissement de la phase stationnaire (48 heures environ).

Extraits acellulaires

Les cellules sont récoltées, lavées une fois à l'eau distillée à 4°C et une fois avec du tampon phosphate de potassium ou du tampon tris-HCL, 10mM pH 7,5. 2ml du culot cellulaire sont ensuite suspendus dans 3 fois leur volume du même tampon. A 8ml de cette suspension cellulaire sont ajoutés 8g de billes de verre (diamètre 0,12mm) et les cellules sont broyées à froid dans l'appareil de Braun (20sec. à la vitesse 1 et 60sec. à la vitesse 2). Les débris cellulaires et les billes de verre sont éliminés par une centrifugation de 3min. à 1.000g. L'extrait ainsi obtenu est conservé dans la glace et est utilisé pour les dosages enzymatiques.

Dosages enzymatiques

La cytochrome c oxydase est dosée selon la méthode de Yonetani et Ray¹¹, la succino cytochrome c oxydoréductase, selon celle de Mackler et coll.¹², la NADH cytochrome c oxydoréductase (NADH₂ : cytochrome c oxydoréductase, E.C.1.6.2.1) selon la méthode de Green et Ziegler¹³ et la malate deshydrogénase (L-malate : NAD oxydoréductase, E.C.1.1.1.37) selon celle de Ochoa¹⁴. Pour la cytochrome oxydase, la succino cytochrome c oxydoréductase et la NADH cytochrome c oxydoréductase, les activités spécifiques représentent les vitesses d'oxydation ou de réduction du cytochrome c de cheval. Elles sont exprimées en variation d'absorption à 550mμ par minute et par milligramme de protéines. L'activité de la malate deshydrogénase est exprimée en nmoles de substrat

transformé par minute et par milligramme de protéines.

Poids secs

Ils sont exprimés grâce à la relation poids sec-densité optique établie pour diverses souches dans différentes conditions de culture.

Techniques biochimiques

Le glucose a été dosé selon la méthode colorimétrique à l'O-toluidine¹⁵ et l'éthanol par l'alcool deshydrogénase de levure¹⁶.

RESULTATS

Le travail précédent avait été effectué à l'aide de cellules cultivées sur milieu solide et l'activité de la cytochrome oxydase était évaluée par la hauteur du pic des cytochromes ($a+a_3$) à 602nm dans un spectre cytochromique de cellules entières¹⁷. Dans ce qui va suivre, nous avons préféré estimer les activités enzymatiques sur des extraits acellulaires après culture en milieu liquide. Ces conditions nous ont paru plus reproductibles et permettent, en outre, le dosage d'autres enzymes de la chaîne respiratoire. Par ailleurs, il convient de remarquer que, d'une manière générale, la culture de mutants à auxotrophies multiples en milieu synthétique glucosé ne permet pas d'obtenir des activités respiratoires élevées. Il nous a donc semblé préférable de tenter de définir les conditions qui, à partir d'un milieu complexe (YPGA), permettent d'obtenir pour de tels mutants des activités respiratoires comparables à celles obtenues en présence d'une source carbonée exclusivement respirable telle que l'éthanol.

Activités spécifiques d'enzymes respiratoires :
comparaison entre une souche mutante auxotrophe pour
l'homosérine et une souche de type sauvage.

La cytochrome c oxydase, la succino cytochrome c oxydoréductase, la NADH cytochrome c oxydoréductase et la malate deshydrogénase ont été dosées chez les deux souches après culture dans différentes conditions (tableau I, p. 7). Après culture en milieu contenant un substrat carboné respirable (milieu YPEA) l'activité spécifique de chaque enzyme est équivalente chez la souche mutante (CC60-13A) et chez la souche de type sauvage (YS5). Au contraire, après culture en milieu contenant un substrat carboné fermentescible (milieu YPGA) les activités spécifiques des mêmes enzymes sont deux à cinq fois plus basses chez CC60-13A que chez YS5. De plus, dans ces conditions (YPGA) il est impossible de détecter une activité cytochrome oxydasique chez le mutant. En ce qui concerne ce dernier enzyme, ceci confirme les précédents résultats^{8,9}. On peut également remarquer (tableau I, p. 7) qu'en 48 heures, en milieu YPGA, la souche CC60-13A atteint une densité cellulaire deux à trois fois plus faible que celle atteinte par la souche YS5. Ces deux phénomènes - abaissement d'activité spécifique d'enzymes respiratoires et arrêt prématuré de croissance chez la souche mutante - pouvaient être dus à une anomalie du métabolisme fermentaire chez cette souche. Nous avons alors dosé le glucose et l'éthanol dans le milieu de culture au cours de la croissance des deux souches.

Etude de la croissance des souches CC60-13A et YS 5
sur YPGA

Les résultats montrent que le glucose est utilisé rapidement par la souche YS5 et que la fin de la phase exponentielle de croissance coïncide avec la présence

TABLEAU I

Teneur en quelques enzymes respiratoires de deux souches de *Sacch.cerevisiae* dans deux conditions de cultures

Les cultures en milieu YPEA sont arrêtées en phase exponentielle et les cultures en milieu YPGA en phase stationnaire de croissance. Les activités spécifiques portées ici sont le résultat de deux expériences indépendantes. Les poids secs correspondent à la densité cellulaire atteinte lors de l'arrêt en phase exponentielle pour les cultures en YPEA et à la densité cellulaire maximale atteinte en milieu YPGA.

Souches	Poids sec (g/l)	Cytochrome oxydase	Succino cyt.c oxydoréductase	NADH cyt.c oxydoréductase	Malate deshydrogénase
Cultures en YPEA					
YS 5	0,5	980	40	330	322
	0,5	1.680	28	-	246
CC60-13A	0,5	2.460	33	200	235
	0,5	1.360	17	-	-
Cultures en YPGA					
YS 5	6,8	2.200	26	630	110
	5,6	1.670	25	208	190
CC60-13A	2,6	0	2,4	25	55
	2,4	0	4,7	175	155

de seulement 0,15g/l de glucose dans le milieu tandis que la concentration en éthanol croît au cours de la première phase de croissance pour atteindre environ 10g/l (figure 1, p.9). Chez la souche mutante CC60-13A le métabolisme fermentaire du glucose est intact : le glucose est éliminé et l'éthanol est formé (figure 1, p.9). Cependant, au début de la phase stationnaire de croissance, 15g/l de glucose sont encore présents dans le milieu de culture. Le glucose est ensuite éliminé lentement sans croissance (0,6g/l à 48 heures). Puisque la souche CC60-13A utilise le glucose et synthétise l'éthanol elle devrait se trouver, après 48 heures de culture, dans les mêmes conditions que la souche de type sauvage et on devrait observer une synthèse de cytochrome oxydase. Or, même après 72 heures de culture sur milieu YPGA, l'activité spécifique de la cytochrome oxydase est toujours nulle chez la souche CC60-13A. Ces expériences ont donc permis d'établir que, chez la souche mutante, la phase stationnaire de croissance ne s'établit pas par épuisement du glucose comme chez la souche de type sauvage.

Causes de l'arrêt de la croissance chez le mutant

Nous avons augmenté la concentration de l'extrait de levure dans le milieu YPGA. On constate (tableau II, p.10) que la densité cellulaire atteinte et l'activité spécifique de la cytochrome oxydase augmentent. Ainsi, l'arrêt de la croissance de CC60-13A sur milieu YPGA semble se produire par épuisement d'un élément nutritif de l'extrait de levure. De ce fait, l'arrêt de croissance se produit avant l'induction de la cytochrome oxydase. L'expression de la déficience du milieu devrait être retardée si l'on diminue la concentration initiale du glucose dans le milieu. En effet, la phase fermentative étant

LEGENDE DE LA FIGURE 1

- X Croissance de la souche YS 5
- △ Croissance de la souche CC60-13A
- Disparition du glucose dans le milieu de culture de la souche YS 5
- Disparition du glucose dans le milieu de culture de la souche CC60-13A
- Apparition de l'éthanol dans le milieu de culture de la souche YS 5
- Apparition de l'éthanol dans le milieu de culture de la souche CC60-13A

En ordonnées : unités logarithmiques

- Densités optiques (A_{650nm}^{1cm}) au spectrophotomètre Beckman DB
- Teneur en glucose ou en éthanol en g/l.

En abscisses : unités linéaires : temps en heures.

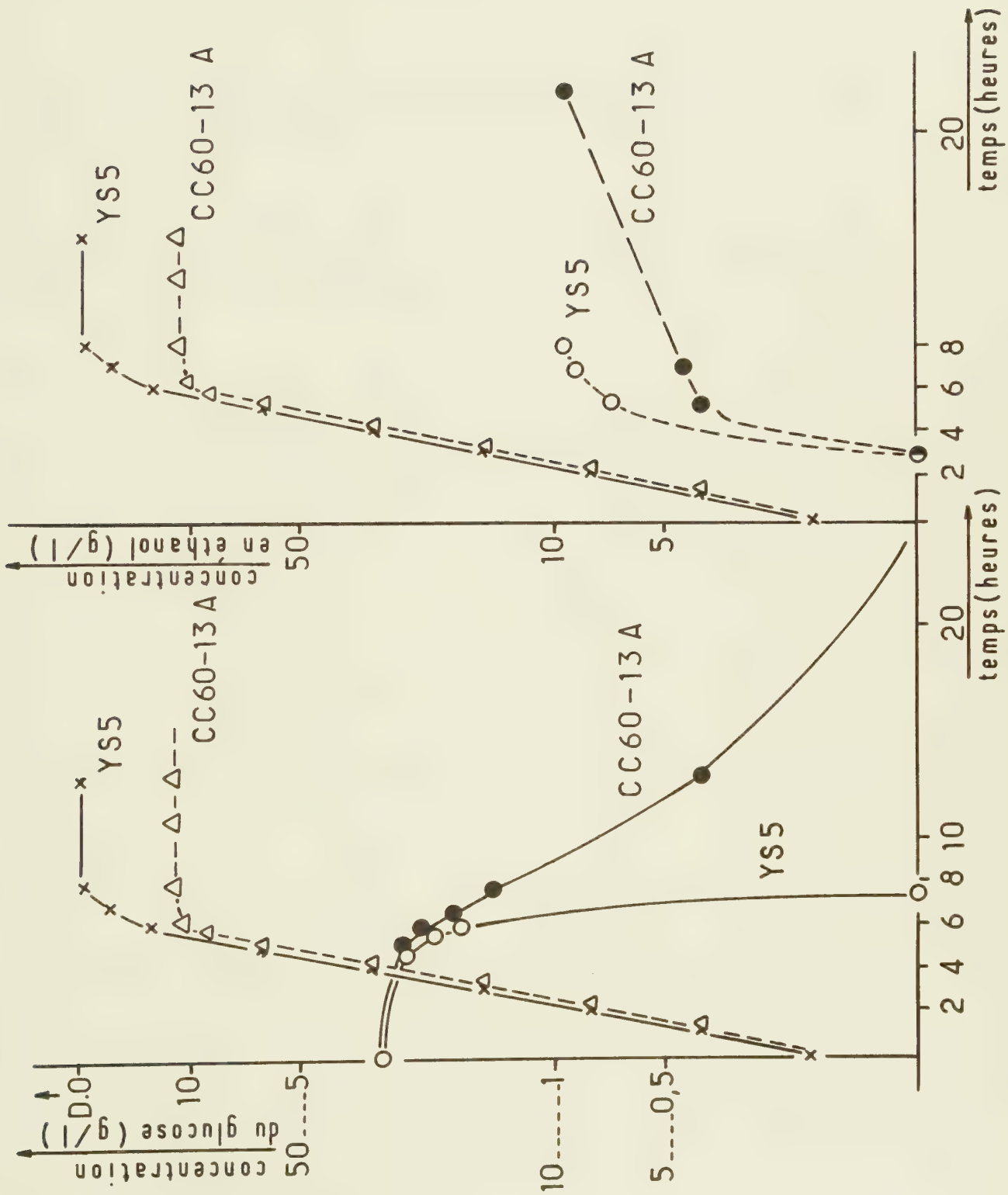


TABLEAU II

Densité cellulaire maximale et teneur en cytochrome oxydase de la souche CC60-13A cultivée sur des milieux YPGA modifiés.

Le milieu de culture contient, en plus du glucose et de l'extrait de levure aux concentrations indiquées, 5g/l de peptone et 20mg d'adénine.

Milieu de culture		Poids sec (g/l)	Cytochrome oxydase
Glucose (g/l)	Extrait de levure (g/l)		
30	5	2,6	0
	10	4,0	0
	15	4,5	145
	20	6,4	710
15	5	2,4	20
	10	4,9	600
	15	6,4	1.280

ainsi plus courte, il y aura production de moins de cellules et le besoin en éléments nutritifs sera moins important. C'est ce que l'on observe : pour une concentration initiale de glucose de 15g/l, l'activité de la cytochrome oxydase apparaît à une concentration en extrait de levure moins élevée qu'en présence de glucose à 30g/l (tableau II, p.10).

Recherche de l'élément nutritif épuisé dans le milieu YPGA par la souche mutante

Les résultats obtenus après culture sur milieu solide² avaient montré que l'addition de L-thréonine 10mM au milieu YPGA permettait d'obtenir un pic de cytochromes ($a+a_3$). Il paraissait donc vraisemblable que l'élément nutritif manquant en fin de croissance fût la thréonine. Il convient de rappeler que CC60-13A est auxotrophe pour la thréonine, la méthionine et l'uracile.

Nous avons donc effectué des cultures de la souche CC60-13A en milieu YPGA normal ou complémenté par la thréonine et par les autres facteurs d'auxotrophie de cette souche, seuls ou en combinaison. Les résultats (tableau III, p.12) montrent que si, en milieu YPGA complémenté par la thréonine ou la méthionine ou l'uracile, on observe une légère augmentation de la densité cellulaire maximale, l'activité spécifique de la cytochrome oxydase reste basse. L'addition simultanée de thréonine et d'uracile ou de thréonine et de méthionine au milieu YPGA provoque une légère augmentation de l'activité spécifique de la cytochrome oxydase, mais ce n'est que par l'addition simultanée, au milieu de culture, des trois facteurs d'auxotrophie de la souche que l'on obtient une activité enzymatique comparable à celle obtenue en milieu YPGA.

TABLEAU III

Influence de l'addition des différents facteurs d'auxotrophie sur la teneur en cytochrome oxydase et la densité cellulaire maximale atteinte de la souche CC60-13A.

Le milieu YPGA contient 15g/l de glucose. Les facteurs d'auxotrophie sont ajoutés au milieu aux concentrations suivantes : L-thréonine : 2mM ; L-méthionine : 1mM ; uracile : 100mg/l.

Additions au milieu YPGA	Poids sec (g/l)	Cytochrome oxydase
-	2,3	25
Thréonine	3,0	68
Méthionine	2,3	23
Uracile	3,1	21
Thréonine + Méthionine	2,9	167
Thréonine + Uracile	3,9	420
Thréonine + Uracile	6,0	1.500
Milieu YPEA	-	1.800

Action de la thréonine en milieu solide

Les résultats précédents nous permettent donc de penser que la souche mutante CC60-13A ne synthétise pas de cytochrome oxydase en milieu YPGA parce que sa croissance s'arrête par épuisement de ses facteurs d'auxotrophie avant que les conditions requises pour l'induction de l'enzyme aient pu s'établir. Cependant, les résultats qui avaient été obtenus sur milieu solide⁹ restaient à expliquer. En effet, en milieu liquide, l'addition de thréonine seule ne permet pas une induction de cytochrome oxydase en présence de la même concentration initiale de glucose que celle utilisée pour les milieux solides, et pour la même souche (CC60-13A). Cependant, il convient de remarquer que, sur milieu solide, les cellules sont cultivées en surface et ne disposent des éléments nutritifs, et, en particulier du glucose, que par diffusion (celle-ci étant vraisemblablement équilibrée avec les besoins de la croissance). De ce point de vue, les conditions de culture ne sont donc pas les mêmes qu'en milieu liquide. Nous devrions donc trouver, en milieu liquide, des conditions équivalentes à celles du milieu solide en diminuant la concentration initiale du glucose. Le tableau IV (p.14) montre que l'activité spécifique de la cytochrome oxydase augmente lorsque la concentration du glucose diminue et qu'au-dessous d'une concentration de 15g/l de glucose on peut voir un effet de la thréonine ajoutée au milieu.

Par ailleurs, les dosages enzymatiques effectués sur des extraits acellulaires, après culture sur milieu solide, montrent que l'activité spécifique de la cytochrome oxydase est faible même chez la souche de type sauvage, comparée à celle obtenue après culture en milieu liquide dans les conditions optimales (comparer les tableaux I, p.7 et V, p.15). Cependant, si l'on

TABLEAU IV

Influence de la concentration en glucose et de l'addition de thréonine sur la densité cellulaire maximale et la teneur en cytochrome oxydase de la souche CC60-13A.

Les résultats sont la moyenne de deux expériences indépendantes.

Additions au milieu YPGA		Poids sec (g/l)	Cytochrome oxydase
Glucose (g/l)	L-thréonine mM		
30	-	2,6	0
	+	3,6	0
15	-	2,4	20
	+	3,2	172
10	-	1,9	166
	+	3,0	300
7,5	-	2,5	400
	+	3,0	1.950

TABLEAU V-

Effet de la thréonine sur la teneur en cytochrome oxydase de deux souches de Sacch.cerevisiae après culture sur milieu solide.

Les cellules sont cultivées sur milieu YPGA solidifié par 30g/l d'agar. Le spectre des cytochromes est enregistré sur la moitié de ces cellules congelées selon la méthode de Claisse et coll.¹⁷. La teneur en cytochromes ($\underline{a}+\underline{a}_3$) est exprimée par la hauteur en mm du pic à 602nmètres. Le reste des cellules est utilisé pour mesurer la teneur en cytochrome oxydase sur un extrait acellulaire selon la méthode décrite dans matériel et méthodes.

Souches	Milieu YPGA		Milieu YPGA + thréonine 10mM	
	cytochrome oxydase	cytochromes ($\underline{a}+\underline{a}_3$)	cytochrome oxydase	cytochromes ($\underline{a}+\underline{a}_3$)
YS 5	312	42	425	36
CC60-13A	49	4	188	15

ajoute de la thréonine au milieu YPGA solide, l'activité spécifique de la cytochrome oxydase chez le mutant CC60-13A augmente de 3,5 fois (tableau V, p.15).

Autres mutants auxotrophes

Dans ce travail, nous avons étudié une souche mutante typique, CC60-13A. Nous avons également vérifié que des souches portant différentes mutations qui entraînent une auxotrophie, soit pour la thréonine seule, soit pour la thréonine et la méthionine, présentaient les mêmes phénomènes. Les résultats (tableau VI, p.17) confirment ceux précédemment publiés^{8,9}. Les souches portant les mutations hom_2 et hom_3 ont une activité cytochrome oxydasique nulle et les souches portant les mutations thr_1 , thr_4 et hom_6 ont une activité cytochrome oxydasique faible, après culture en milieu YPGA. Dans tous les cas, l'activité spécifique de cet enzyme augmente lorsqu'on accroît la concentration de l'extrait de levure dans le milieu. La souche portant la mutation asp_5 , qui est auxotrophe pour l'aspartate¹⁸ a une activité cytochrome oxydasique comparable à celle d'une souche de type sauvage.

En ce qui concerne les autres mutants (tableau VI, p.17), si l'on compare les activités cytochrome oxydasique après culture sur YPGA contenant 5g/l et 15g/l d'extrait de levure, on constate que la première concentration permet d'obtenir une activité maximale chez un mutant auxotrophe pour la lysine mais une activité atteignant seulement la moitié de l'activité maximale chez un mutant auxotrophe pour l'adénine et l'uracile. De plus, il est intéressant de remarquer que des souches auxotrophes pour l'adénine seule (YS5) ou l'uracile seul (19-11R3) ont une activité spécifique de cytochrome oxydase maximale après culture sur YPGA à 5g/l d'extrait

TABLEAU VI

Densité cellulaire maximale et teneur en cytochrome oxydase chez différentes souches de *S. cerevisiae* après culture dans différents milieux.

Le milieu YPGA contient du glucose à 15g/l et l'extrait de levure aux concentrations indiquées. Les facteurs d'auxotrophie sont ajoutés aux concentrations indiquées dans la légende du tableau III et l'adénine à 100mg/l.

Souches	Génotypes	Exigences	Extrait de levure (g/l)					
			5			15		
			Poids sec (g/l)	cyt. oxydase	poids sec (g/l)	cyt. oxydase	poids sec (g/l)	cyt. oxydase
113-2A	ade ₂ , ura ₁ , hom ₃	ade - ura - thr - met	1,8	0	3,1	232	4,9	930
19-11	ura ₁ , hom ₂	ura - thr - met	2,6	0	5,6	850	-	-
JE 2	ade ₂ , hom ₂	ade - thr - met	2,8	0	5,0	750	-	-
23-3	hom ₂	thr - met	3,2	0	5,5	1.100	7,0	1.400
JE 67	ade ₂ , hom ₆	ade - thr - met	3,1	80	5,8	910	-	-
T1-6	ade ₂ , ura ₁ , thr ₁	ade - ura - thr	2,0	276	4,0	1.800	-	-
T4-8	ade ₂ , thr ₄	ade - thr	3,0	160	4,0	380	-	-
CH 104-3	asp ₅	asp	4,0	1.700	4,0	1.470	-	-
D 240 1B	lys ₂	lys	4,5	1.160	5,2	1.370	-	-
4094-B	ade ₂ , ura ₁	ade - ura	2,4	550	5,0	1.400	-	-
19-11R3	ura ₁	ura	5,2	1.760	-	-	-	-
YS 5	ade ₂	ade	-	-	-	-	-	-
23-3R4	-	-	5,0	1.100	-	-	-	-
								-
								17
								-

de levure, et qu'un mutant réverse prototrophe (23-3R4) obtenu à partir d'une souche portant la mutation hom_2 se comporte comme une souche de type sauvage.

DISCUSSION

Les résultats décrits ici montrent que les hypothèses qui avaient été formulées précédemment⁹ en tenant compte de la spécificité apparente du phénomène (cytochrome oxydase d'une part, thréonine d'autre part) doivent être élargies. D'une part, chez les mutants auxotrophes pour la thréonine, nous avons montré que la synthèse d'au moins deux autres enzymes de la voie respiratoire est influencée parallèlement à celle de la cytochrome oxydase, bien que de façon moins dramatique que celle de cette dernière. D'autre part, il est apparu que pour les souches portant plusieurs caractères d'auxotrophie, un effet de composés autres que la thréonine, adénine, uracile et méthionine en particulier (seuls ou en combinaison avec la thréonine) pouvait également être mis en évidence.

D'après les expériences rapportées ici, le manque de cytochrome oxydase chez les souches exigeant la thréonine pour leur croissance est dû à un épuisement du milieu utilisé (YPGA), entraînant un arrêt prématuré des synthèses protéiques avant que les conditions nécessaires à la synthèse de la cytochrome oxydase ne se soient établies. Il convient de noter qu'en présence d'une source carbonée uniquement respirable telle que l'éthanol, cet épuisement se décèle seulement sur le rendement cellulaire, les enzymes respiratoires étant présents dès le début de la croissance. En fait, on peut rétablir la synthèse de la cytochrome oxydase en milieu YPGA, soit

en augmentant la concentration en facteurs d'auxotrophie, soit en diminuant la concentration en glucose. L'équipement du milieu n'est pas seulement sensible pour les souches auxotrophes pour la thréonine. En effet, des souches ayant d'autres auxotrophies présentent le même effet après culture sur le milieu YPGA, mais le phénomène est alors moins accentué (souche 4094-B, ade_2 , ura_1 , par exemple). Par ailleurs, il semble que l'accumulation des exigences ait un effet synergique. En effet, sur le même milieu YPGA, des souches portant les mutations ade_2 ou ura_1 peuvent croître jusqu'à une densité cellulaire telle que l'activité spécifique de leur cytochrome oxydase soit maximale. Par contre, une souche portant simultanément les deux mutations ade_2 et ura_1 ne pourra croître que de façon à atteindre une activité spécifique de cytochrome oxydase égale à environ la moitié de l'activité maximale. Il est tentant de généraliser cet effet synergique, d'autant plus qu'il semble se vérifier même chez les souches auxotrophes pour la thréonine et portant ou non d'autres mutations si l'on se réfère aux densités cellulaires maximales (voir tableau VI, p.17).

En conclusion, il apparaît qu'une explication générale peut être donnée, laquelle requiert cependant une adaptation à chaque cas particulier. Chaque souche aurait une carence prépondérante en fin de croissance, sur le milieu utilisé, lequel deviendrait alors déséquilibré en ce qui concerne les concentrations respectives du glucose et des éléments contenus dans l'extrait de levure. Les résultats présentés dans ce travail rendent vraisemblable que la déficience apparente en cytochrome oxydase de nombreuses souches de Sacch.cerevisiae portant des caractères d'auxotrophies variés, mais qui ne sont pas génétiquement "petites", puisse résulter d'un tel déséquilibre nutritionnel.

La démonstration étant ainsi faite que seules les conditions physiologiques utilisées précédemment en milieu naturel glucosé s'opposaient à la dérégpression totale de la synthèse de cytochrome oxydase chez de tels mutants^{8,9}, il est raisonnable de penser que des conditions de culture puissent désormais être trouvées qui, dans chaque cas, permettront d'obtenir la synthèse dérégprimée de tous les enzymes respiratoires même en milieu synthétique glucosé.

Le fait que, dans le même temps et dans les mêmes conditions expérimentales, d'autres enzymes respiratoires, tels que la cytochrome c, la succino-cytochrome c oxydoréductase ou la malate deshydrogénase puissent être partiellement ou totalement synthétisés, permet de penser que le déséquilibre nutritionnel que nous venons de mettre en évidence chez divers mutants auxotrophes affecte plus particulièrement l'apparition de protéines dont le déterminisme génétique met en jeu un caractère mitochondrial.

REFERENCES

1. F. Shermann, J.W., Stewart, J.H. Parker, G.J. Puttermann, B.B.L. Agrawal and E. Margoliash, Symp.Soc.Exp.Biol. n°24, Cambridge University Press, 1970, p. 85-107.
2. G.D. Clark-Walker and A.W. Linnane, J.Cel.Biol. 34(1967)1.
3. P.P. Slonimski, La formation des enzymes respiratoires chez la levure, Masson, Paris, 1953.
4. P.S. Perlman and H.R. Malher, J.Bio.Energetics 1 (1970) 113.
5. P.P. Slonimski, Proc. 3rd Intern.Congr.Biochem. Brussels, Academic Press, New York, 1956, p. 242-252.
6. A.A. Sels and A.M. Verhulst, Europ.J.Biochem. 19 (1971) 115.
7. L. Clavillier, Thèse de Doctorat de spécialité, Université de Paris, 1962.
8. Y. Surdin, H. de Robichon-Szulmajster, T.M. Lachowicz and P.P. Slonimski, Europ.J.Biochem. 7 (1969) 526.
9. H. de Robichon-Szulmajster, Y. Surdin and P.P. Slonimski, Europ.J.Biochem. 7 (1969) 531.
10. R.C. von Borstel (Ed.), Microbial Genetics Bulletin, n°25, Oak Ridge, U.S.A., 1966.
11. T. Yonetani and G.S. Ray, J.Biol.Chem. 240 (1965) 3392.
12. B. Mackler, P.J. Collip, H.M. Duncan, N.A. Rao and F.M. Huennekens, J.Biol.Chem. 237 (1962) 2968.
13. D.E. Green and D.M. Ziegler, dans "Methods in Enzymology" 6 (1963) 416, S.P. Colowick and N.O. Kaplan Edrs., Academic Press New York and London.
14. S. Ochoa, dans "Methods in Enzymology" 1 (1955) 735. S.P. Colowick and N.O. Kaplan Edrs., Academic Press, New-York and London.

15. J. Loiseleur, dans "Techniques de laboratoire" 2 (1969) 249.
16. L.L. Salomon and J.E. Johnsson, Anal.Chem. 31(1959)453.
17. M.L. Claisse, G.A. Péré-Aubert, L.P. Clavillier and P.P. Slonimski, Eur.J.Biochem. 16 (1970) 430.
18. H. de Robichon-Szulmajster, Y. Surdin and R.K. Mortimer, Genetics 53 (1966) 609.

Service de Reprographie
C . N . R . S .
Gif

